

# Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost i tehnološka svojstva pšeničnih posija

---

Gregov, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:159:677442>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International / Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

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



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2020.

Marija Gregov  
1225/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA  
VISOKOG INTENZITETA NA  
ENZIMSKU AKTIVNOST I  
TEHNOLOŠKA SVOJSTVA  
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 mag. ing. Matee Habuš.

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

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni, mag. ing. Matei Habuš te Lidiji Drobac, univ. bacc. ing. koje su mi omogućile izradu diplomskog rada te uvijek imale strpljenja i vremena za moje upite.*

*Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji, osobito roditeljima koji su me pratili u svim padovima i usponima, a pritom vraćali na pravi put. Također veliko hvala prijateljima i kolegama koji su studiranje, ali i život, učinili lakšim i zabavnijim.*

*Velika HVALA svima!*

## 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 ENZIMSKU AKTIVNOST I TEHNOLOŠKA SVOJSTVA PŠENIČNIH POSIJA

*Marija Gregov, 1225/PI*

**Sažetak:** Zbog visokog udjela prehrambenih vlakana i bioaktivnih tvari, pšenične posije predstavljaju koristan nusproizvod prehrambene industrije koji doprinosi boljem zdravlju čovjeka. Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta (UVI) na enzimsku aktivnost i tehnološka svojstva pšeničnih posija. Utvrđeno je kako tretman posija UVI smanjuje aktivnost njihovih enzima (polifenol oksidaze, peroksidaze i lipaze) ovisno o udjelu posija u vodenoj suspenziji (15 g vs. 30 g u 100 mL vode). Ultrazvukom obrađene posije, dodane u pšenično brašno, manje narušavaju njegova tehnološka svojstva u odnosu na native posije, i to: sposobnost stvaranja glutenske mreže na Glutopeaku i želatinizirajuća svojstva (viskoznost) na mikroviskoamilografu. Posije tretirane UVI povećavaju tvrdoću, gumenost i rezilijenciju krušnog tijesta, dok elastičnost i kohezivnost ostaju nepromijenjeni. Odgođena fermentacija (48 h) smanjuje negativne promjene na tijestu izazvane tretmanom posija. Specifični volumen, oblik, čvrstoća sredine, svjetlina ( $L^*$ ) i intenzitet crvenila ( $a^*$ ) ne ovise o tretmanu, dok se intenzitet žute boje ( $b^*$ ) sredine kruha povećao. Ultrazvučna obrada posija doprinosi njihovoj stabilnosti uspješnom inaktivacijom enzima te poboljšava pojedina tehnološka svojstva čime bi se omogućila veća primjenjivost posija u pekarskoj industriji.

**Ključne riječi:** pšenične posije, ultrazvuk visokog intenziteta, tehnološka svojstva, aktivnost enzima

**Rad sadrži:** 55 stranica, 12 slika, 9 tablica, 111 literaturnih navoda, 1 prilog

**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. Tomislava Vukušić Pavičić
2. izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni
3. doc. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustać
4. doc. dr. sc. Filip Dujmić (zamjena)

**Datum obrane:** 28. veljače 2020.

## 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 ENZYME ACTIVITY AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF WHEAT BRAN

*Marija Gregov, 1225/PI*

**Abstract:** *Due to the high content of dietary fiber and bioactive substances, wheat bran is a useful by-product of the food industry that contributes to human health. The aim of this study was to investigate the impact of high-intensity ultrasound (HIU) treatment on the enzymatic activity and technological properties of wheat bran. Ultrasound treatment was found to reduce the activity of bran's enzymes (polyphenol oxidases, peroxidases and lipases), depending on the content of the bran in aqueous suspension (15 g vs. 30 g in 100 mL of water). Ultrasound-treated bran in a mixture with wheat flour less impairs its technological properties, namely the ability to form a gluten network on Glutopack and gelatinizing properties (viscosity) on a microviscoamylograph. Ultrasound treatment increases the hardness, gummyness and resilience of bread dough, while the springiness and cohesiveness remain unchanged. Delayed fermentation (48 h) reduces the negative changes in the dough caused by the treatment of bran. Specific volume, shape, strength of the bread crumb, brightness ( $L^*$ ) and intensity of red color ( $a^*$ ) do not depend on treatment, while the intensity of yellow color ( $b^*$ ) of the bread crumb increased. Ultrasonic processing of bran contributes to their stability for successful inactivation of enzymes and improves individual technological properties, which would allow greater applicability of bran in the bakery industry.*

**Keywords:** wheat bran, high-intensity ultrasound, processing properties, enzyme activity

**Thesis contains:** 55 pages, 12 figures, 9 tables, 111 references, 1 supplement

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

**Technical support and assistance:** *Matea Habuš, MSc*

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 28 February 2020

## Sadržaj

stranica

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Pšenične posije.....	3
2.1.1. Trajnost posija i metode stabilizacije.....	4
2.1.2. Tehnološka i senzorska svojstva posija.....	4
2.2. Ultrazvuk visokog intenziteta.....	5
2.2.1. Mehanizam djelovanja.....	6
2.2.2. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji i preradi žitarica.....	7
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	9
3.1. Materijali.....	9
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Usitnjavanje i određivanje raspodjele veličine čestica posija.....	12
3.2.2. Određivanje udjela vode i suhe tvari.....	14
3.2.3. Određivanje udjela topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana (prema metodi AOAC 2011.25).....	14
3.2.3.1. Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana.....	15
3.2.3.2. Određivanje topljivih prehrambenih vlakana.....	16
3.2.3.3. Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS).....	16
3.2.3.4. Određivanje količine pepela.....	17
3.2.3.5. Određivanje udjela dušika (proteina) po Kjeldahl-u.....	18
3.2.4. Ultrazvučna obrada posija.....	19
3.2.4.1. Liofilizacija.....	20
3.2.5. Određivanje enzimske aktivnosti.....	20
3.2.5.1. Polifenol oksidaza.....	20
3.2.5.2. Peroksidaza.....	21
3.2.5.3. Lipaza.....	21
3.2.6. Određivanje tehnoloških svojstava smjese brašna i posija.....	22
3.2.6.1. Određivanje kinetike agregacije glutena.....	22
3.2.6.2. Svojstva želatinizacije škroba na mikroviskoamlografu.....	22
3.2.7. Postupak pripreme tijesta i kruha s posijama.....	23
3.2.8. Određivanje reoloških svojstava krušnog tijesta s dodatkom posija.....	24
3.2.9. Određivanje parametara boje tijesta i sredine kruha.....	25
3.2.10. Svojstva kvalitete kruha.....	26
3.2.11. Obrada podataka.....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	27
4.1. Svojstva pšeničnih posija.....	27
4.1.1. Raspodjela veličine čestica.....	27
4.1.2. Udio vode i suhe tvari.....	29
4.1.3. Udio topljivih i netopljivih vlakana.....	29
4.2. Promjena temperature tijekom različitih načina obrade.....	30
4.3. Aktivnost enzima posija.....	31
4.3.1. Polifenol oksidaza.....	32
4.3.2. Peroksidaza.....	33
4.3.3. Lipaza.....	34
4.4. Tehnološka svojstva tretiranih posija u smjesi brašna.....	35
4.4.1. Agregacija glutena.....	35
4.4.2. Svojstva želatinizacije škroba.....	37
4.5. Reološka svojstva krušnog tijesta s dodatkom posija.....	39
4.6. Boja krušnog tijesta s posijama tijekom odgođene fermentacije.....	40
4.7. Svojstva kvalitete kruha s posijama.....	41
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	44
<b>6. LITERATURA</b> .....	45
<b>7. PRILOZI</b> .....	55



# 1. UVOD

Kruh i pekarski proizvodi diljem svijeta konzumiraju se kao glavni dio ljudske prehrane zbog visokog omjera energetske vrijednosti i cijene, ali i važnih nutritivnih sastojaka. Pšenica, odnosno pšenično brašno sirovina je za proizvodnju kruha i pekarskih proizvoda poput tjestenine, keksa, snack-proizvoda, torti, kolača te žitarica za doručak (Škrbić i Filipčev, 2008; Demir i Elgün, 2013). Poznata kao vodeća svjetska žitarica za ljudsku prehranu te životinjsku ishranu, zrno pšenice (*Triticum aestivum*) sastoji se od 3 glavne komponente: endosperma, klice i posija. Endosperm bogat škrobom se melje u brašno, dok su klica i posije nusproizvodi različite namjene (Onipe i sur., 2015).

Zbog visokog udjela prehrambenih vlakana, pšenične posije mogu poslužiti kao njihov izvor. U zapadnoj populaciji se općenito konzumira manje prehrambenih vlakana od preporučenih doza pa se u novije vrijeme nastoji integrirati ih u hranu koja se svakodnevno konzumira (Stevenson i sur., 2012). Studije su pokazale kako konzumacija pšeničnih posija potencijalno može prevenirati pretilost, pomoći regulaciji šećera u krvi, smanjiti rizik razvoja raka debelog crijeva i kardiovaskularnih bolesti (Fardet, 2010; Stevenson i sur., 2012).

No dodatak posija u mlinske i pekarske proizvode predstavlja izazov zbog njihove podložnosti kvarenju i nepoželjnog utjecaja na senzorska i fizikalna svojstva kvalitete gotovog proizvoda. Stoga, maksimalni udio dodanih pšeničnih posija ne bi trebao preći 20 % u cilju očuvanja poželjnih senzorskih svojstava proizvoda (Wang i sur., 2002; Peressini i Sensidoni, 2009; Lebesi i Tzia, 2011; Laddomada i sur., 2015; Pasqualone i sur., 2015). Zbog svoje nestabilnosti i kratkog roka trajanja, u literaturi se mogu pronaći razne studije utjecaja različitih procesa stabilizacije pšeničnih posija i klice poput tretiranja antioksidansima, mikrovalovima, infracrvenim zagrijavanjem, autoklaviranjem, zagrijavanjem pečenjem ili prženjem s ciljem uporabe za industrijsku proizvodnju (Srivastava i sur., 2007; Demir i Elgün, 2013).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost i tehnološka svojstva pšeničnih posija. Odredit će se svojstva pšeničnih posija (veličina čestica, udio vode i vlakana), aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze i lipaze, utjecaj dodatka posija (20 %) u brašno na svojstva agregacije glutena i želatinizacije škroba, fizikalna svojstva tijesta i kruha iz odgođene fermentacije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PŠENIČNE POSIJE

Procesom mljevenja zrna pšenice u brašno, kao nusproizvod dobivaju se pšenične posije. Posije se uglavnom koriste kao stočna hrana ili za proizvodnju goriva, a svega 10 % od ukupno proizvedenih posija se koristi za proizvodnju hrane, prvenstveno integralnih proizvoda od žitarica. No, pšenične posije su jestive i hranjive, jer sadrže brojne vrijedne hranjive i bioaktivne tvari.

Pšenične posije smatraju se funkcionalnim sastojkom u proizvodnji zdravije hrane jer se sastoje od prehrambenih vlakana (arabinoksilani, lignin, celuloza, galaktan, fruktan), vitamina, minerala te bioaktivnih tvari (ferulinska kiselina, flavonoidi, karotenoidi, alkilrezorcinol, lignani i steroli, betain i kolin) (Apprich i sur., 2013; Andersson i sur., 2014; De Brier i sur., 2014; Onipe i sur., 2015). Od vitamina, najprisutniji su vitamini B kompleksa (tiamina, riboflavina, niacina, pantotenske kiseline, piridoksina, biotina i folata), oko 30 mg/100 g. Najzastupljenije mineralne tvari su željezo, cink, mangan, magnezij te fosfor. Većina fosfora (oko 80%) nalazi se u obliku fitata koji tvore komplekse s ostalim mineralima čime se smanjuje biodostupnost tih minerala. Sekundarni metaboliti biljaka su fenolne kiseline, antioksidansi koji imaju povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka poput prevencije bolesti krvožilnog te gastrointestinalnog sustava. Fenolne kiseline najčešće su kovalentno vezane na polimere staničnih stijenki (Adom i sur., 2005; Laddomada i sur., 2015).

Zbog povoljnog utjecaja na zdravlje, raste potražnja za namirnicama koje ih sadrže, dok je EFSA (*eng.* European Food Safety Authority; *hrv.* Europska agencija za sigurnost hrane) odobrila dvije zdravstvene tvrdnje vezane za prehrambena vlakna: doprinose povećanju fekalne mase (povećavaju peristaltiku crijeva) te ubrzavaju prolaz nutrijenata probavnim sustavom (European Union, 2011). Osim što su izvrstan izvor vlakana, posije su i jeftin izvor prehrambenih vlakana koja povezuju sa zdravljem probavnog sustava te kao potencijalna prevencija raka crijeva, a procjenjuje se kako je godišnja proizvodnja za ljudsku potrošnju oko 90 milijuna tona (Onipe i sur., 2015).

Posije sadrže značajnu količinu visokovrijednih proteina (14-19 g/100 g), a njihova količina ovisi o sorti i uvjetima uzgoja pšenice (Shewry i sur., 2009). Proteini aleuronskog sloja (86 %) visoko su probavljivi. Najvećim dijelom su skladišni globulini, molekulske mase manje

od 30 kDa i sadrže više lizina, asparagina i glutamina od proteina glutena. Posije sadrže i značajnu količinu slobodnih aminokiselina sa sumporom (0,6 %), metionina i cisteina (Fardet, 2010) koji su prekursori nastanka glutaciona, unutarstaničnog antioksidansa, koji doprinosi oksidativnom statusu stanica.

Osim za ekstrakciju vlakana i bioaktivnih tvari, Laddomada i suradnici (2015) ističu kako se pšenične posije koriste i za ekstrakciju prisutnog ulja koje je bogato polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, karotenoidima te kvinonima (Eisenmenger i Dunford, 2008; Durante i sur., 2012a), a ti sastojci se kasnije koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Kwon i sur., 2010; Durante i sur., 2012a) gdje se mikroinkapsulacija pokazala kao najbolja metoda stabilizacije proizvoda s kratkim rokom trajanja (Bhandari i sur., 1999; Durante i sur., 2012b).

Pšeničnim posijama se, kao povoljnim izvorom vlakana i drugih bioaktivnih tvari, mogu obogaćivati pekarski, ali i ostali proizvodi, iako je njihova glavna karakteristika nepovoljan utjecaj na tehnološka i senzorska svojstva proizvoda. Kod kruha bi to značilo proizvod manje kvalitete neprivačan kupcu, odnosno bilo bi potrebno upotrijebiti razne poboljšivače koji bi poskupili proizvodnju i dodatno smanjili prihvatljivost kod potrošača (Albers i sur., 2009; Hemdane i sur., 2016; Jacobs i sur., 2018).

#### 2.1.1. Trajnost posija i metode stabilizacije

Pšenična klica sadrži polinezasićene masne kiseline (Rizzelo i sur., 2010) te endogene enzime, poput lipaze i lipooksigenaze, koji uzrokuju kvarenje, a inaktivacijom enzima bi se rok trajnosti mogao produžiti (Tolouie i sur., 2018).

Stabilizaciju posija moguće je provesti klasičnom primjenom topline, primjerice za lipaze i reducirajuće tvari grijanjem u sušnici ili autoklaviranjem (Kock i sur., 1999), a za potpunu inaktivaciju lipaze prženje u cirkulacijskoj pećnici (Lei i sur., 2017), dok je za smanjenje aktivacije pogodan mikrovalni tretman (Nandeesh i sur., 2011); peroksidaza se uspješno inaktivira parenjem posija pregrijanom odvlaženom parom (Zhang i sur., 2018).

### 2.1.2. Tehnološka i senzorska svojstva posija

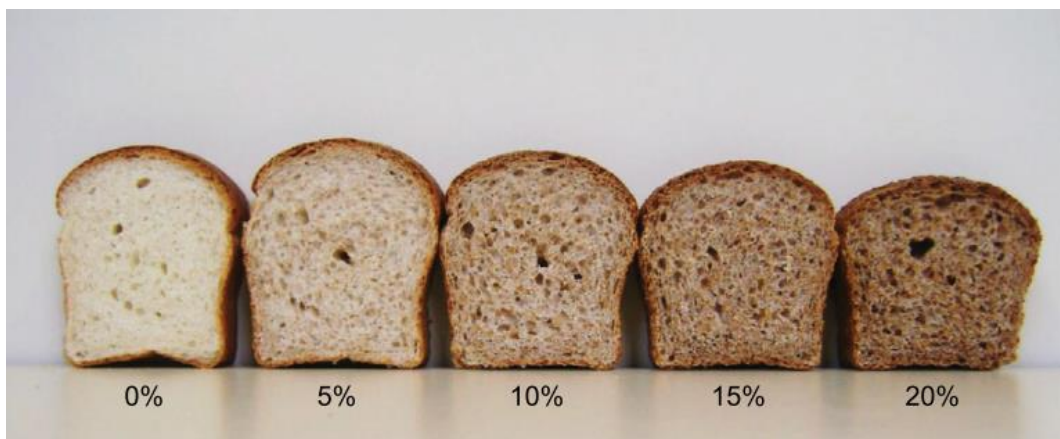
Posije se najčešće koriste u obliku integralnih brašna ili za obogaćivanje raznih proizvoda od žitarica: pekarskih proizvoda, keksa, kolača, žitarica za doručak, snack proizvoda, dječje hrane, tjestenine i drugih prehrambenih proizvoda. Parametri tehnoloških svojstava pekarskih proizvoda ugrubo se mogu podijeliti na vanjske i unutarnje. Vanjski se smatraju masa tijesta, volumen, specifični volumen, boja kore; dok su unutarnji boja i tvrdoća sredine kruha (Demir i Elgün, 2013).

Almeida i sur. (2013) dokazali su kako se povećanjem udjela dodanih pšeničnih posija u zamjes smanjuje specifični volumen kruha. Pšenične posije i klica sadrže visoki udio proteina glutaciona koji je reducirajuća tvar i stvara disulfidne veze s glutenskom mrežom čime uzrokuje smanjenje volumena pekarskog proizvoda. Visoka temperatura inaktivira proteolitičke enzime, ali i glutation, čime jača glutenska mreža (Demir i Elgün, 2013).

Arabinoksilani, kao bioaktivne komponente i neškrobni polisaharidi posija, vodikovim vezama vežu slobodnu vodu čime se smanjuje dostupna voda za stvaranje glutenske mreže, odnosno produžuje se vrijeme stvaranja mreže te se smanjuje stabilnost tijesta. Također se smanjuju elastičnost i sposobnost tijesta da zadrži plinove nastale fermentacijom što uzrokuje manji volumen pekarskog proizvoda (slika 1) (Serna-Saldivar, 2010; Onipe i sur., 2015). Smatra se i kako veličina čestica posija utječe na fizikalna svojstva proizvoda, odnosno kako smanjenjem veličine čestica pada i negativni utjecaj na svojstva proizvoda. Toplinskom obradom posija mogu se inaktivirati termolabilni endogeni enzimi brašna, te potencijalno poboljšati njihova tehnološka svojstva.

U klici se nalazi najveći udio  $\alpha$ -amilaze i polifenol oksidaze, dok je  $\beta$ -amilaza ravnomjerno raspoređena u posijama i endospermu zrna (Hidalgo i sur., 2013). Primjena topline, poput parenja posija pregrijanom odvlaženom parom, inaktivira  $\alpha$ -amilazu i endoksilanaze (Zhang i sur., 2018). Kako polifenol oksidaza narušava nutritivna i senzorska svojstva prehrambenih proizvoda (negativni utjecaj na okus, teksturu i boju proizvoda poput rezanaca i kruha od integralnog brašna), poželjno je inhibirati njenu aktivnost (Anderson i Morris, 2001; Niu i sur., 2014). Obradom posija uspješno se može smanjiti aktivnost polifenol oksidaze, amilolitičkih i proteolitičkih enzima, (Dornez i sur., 2008; De Brier i sur., 2015) koji utječu na tehnološka svojstva brašna s posijama. Iako su Niu i sur. (2014) uspješno dokazali inaktivaciju polifenol oksidaze u pšeničnim posijama tretiranjem ultrazvukom visokog intenziteta uz dodatak

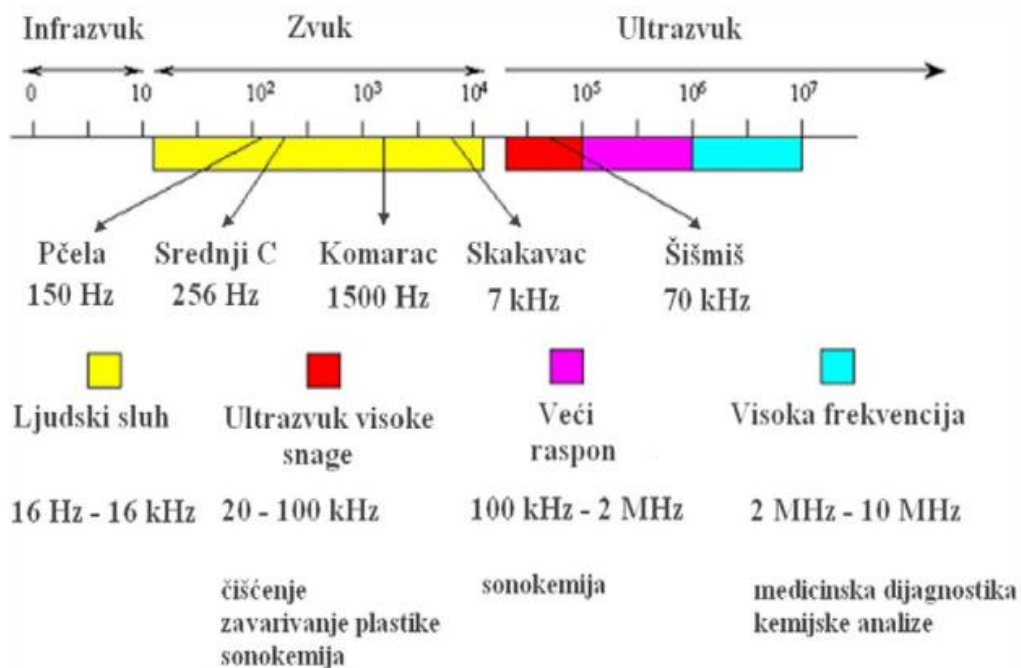
askorbinske kiseline i glutationa, Čukelj Mustač i sur. (2019) su dokazali kako kod posija prosa tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta aktivnost polifenol oksidaze raste što ukazuje na to da utjecaj tretmana ovisi o proizvodu koji se tretira.



**Slika 1.** Zamjena bijelog pšeničnog brašna određenim udjelom pšeničnih posija (Hemdane i sur., 2016).

## **2.2. ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA**

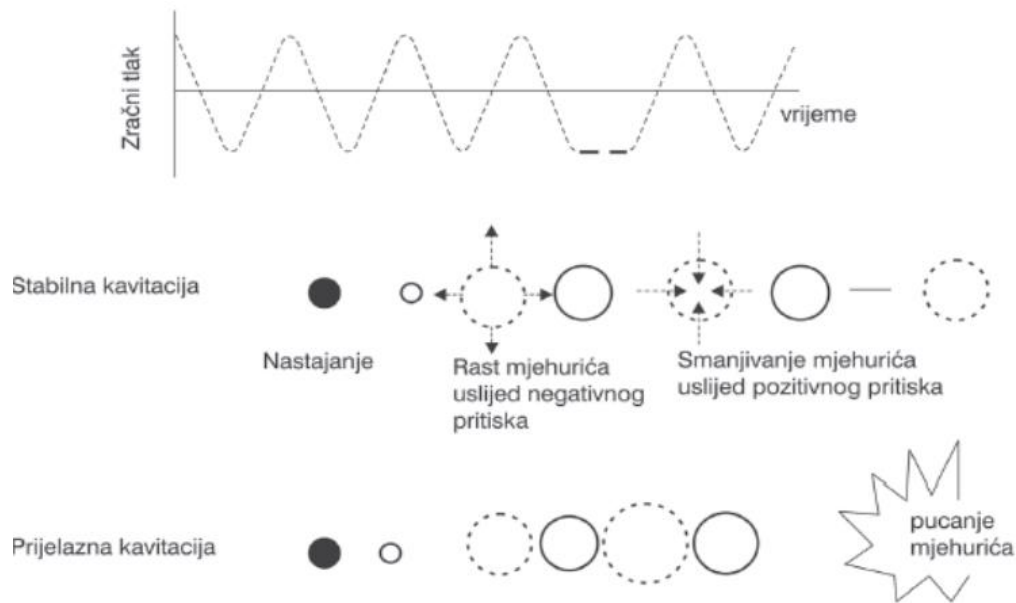
Valovi s frekvencijom većom od 16 000 Hz nazivaju se ultrazvučni valovi te se nalaze iznad gornjeg praga osjetljivosti ljudskog sluha (slika 2). Frekvencije valova dijele se u dva područja, odnosno područje niskog i područje visokog intenziteta. Karakteristike ultrazvuka niskog intenziteta su snaga manja od  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , frekvencija 5-10 MHz te se koristi za analitičke svrhe (određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane) zbog toga što ne dolazi do fizičkog oštećenja materijala. Suprotno njemu, ultrazvuk visokog intenziteta ima snagu između 10 i 1000  $\text{W cm}^{-2}$ , frekvencija mu je 2,5-5 MHz te se koristi za različite procese prerade hrane jer izaziva fizička oštećenja materijala (Lelas, 2006).



**Slika 2.** Podjela frekvencija valova zvuka (Mason, 1998 prema Režek Jambrak i sur., 2010).

### 2.2.1. Mehanizam djelovanja

Lelas (2006) opisuje kako ultrazvučni valovi izazivaju kompresiju ili smicanje valova u namirnici kroz koju putuju, ali i u mediju kroz koji se šire zbog čega dolazi do promjena u temperaturi i tlaku. Te promjene dovode do kavitacije, odnosno stvaranja kavitacijskih mjehurića (slika 3) koji induciraju nastanak slobodnih radikala, oštećenja staničnih membrana, a samim time i kemijske reakcije. Ovisno o željenom cilju u proizvodnji, ultrazvuk doprinosi ubrzavanju kemijskih reakcija, olakšavanju ekstrakcije, homogenizacije i emulgiranja, ubrzavanju sušenja i kristalizacije te inaktivaciji enzima (ovisno o građi, može doći i do povećanja aktivnosti enzima) te uništavanju mikroorganizama. Princip djelovanja temelji se na tome da se u kratkom vremenu (mikrosekunde) postižu visoki tlak (do 50 MPa) i visoka temperatura (oko 5000 °C) što utječe na obližnje molekule: mijenja im strukturnu građu ili ubrzava proces izmjene mase (Leighton, 1998).



**Slika 3.** Stabilna i prijelazna kavitacija (Kuijpers, 2002 prema Herceg i sur., 2009).

### 2.2.2. Primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji i preradi žitarica

Ultrazvuk visokog intenziteta ima potencijalnu primjeru u različitim procesima jer skraćuje vrijeme i povećava učinkovitost procesa, troši malo energije te nema lošeg utjecaja na okoliš (Zhu, 2015; Falsafi i sur., 2019).

U prehrambenoj industriji primjena ultrazvučnih procesa pozitivno utječe na okoliš time što reducira uporabu kemijskih otapala, smanjuje potrebno vrijeme ekstrakcije, povećava iskoristivost procesa te poboljšava kvalitetu proizvoda (Wang i Weller, 2008; Laddomada i sur., 2015). Prema Awad i sur. (2012), za poboljšanje prehrambene tehnologije, ultrazvuk se koristi kao alternativa za procese otpjenjavanja, smrzavanja, emulgiranja, ekstrakcije, sušenja i hidratacije (Miano i sur., 2017).

Ultrazvuk visokog intenziteta pri pranju zrna prije mljevenja uspješno je primijenjen u svrhu reduciranja fitata u pšeničnim posijama putem uklanjanja aleuronskog sloja (Guo i sur., 2015). U procesu mokrog mljevenja zrna kukuruza, tretman ultrazvukom smanjuje vrijeme hidratacije zrna za 35%, a svojstva škroba ostaju nepromijenjena (Miano i sur., 2017). Smanjenjem vremena procesa ostvaruje se velika ušteda na financijskim troškovima.

Laddomada i sur. (2015) ukazuju na mogućnost ekstrakcije fenolnih kiselina iz pšeničnih posija pomoću ultrazvučnih procesa koje se onda kao takve mogu koristiti u pekarskim proizvodima ili kao sirovina u proizvodnji tjestenine (Wang i Weller, 2006; Wang i sur., 2008; Pasqualone i sur., 2015). Za ekstrakciju fenolnih spojeva uz pomoć ultrazvuka nije potrebna prethodna kemijska hidroliza uzorka jer se ekstrakcija bazira na kavitacijskim mjehurićima u otapalu koji pospješuju izdvajanje fenola. Time je smanjen i negativni utjecaj kemikalija na okoliš (Wang i sur., 2008). Niu i sur. (2014) uspješno su dokazali inaktivaciju polifenol oksidaze tretmanom ultrazvuka uz uporabu antioksidansa (askorbinske kiseline i glutaciona).

Izolati proteina pšenice i soje imaju emulgirajuća svojstva te vrlo malu topljivost, a tretman ultrazvuka poboljšava ta svojstva i njihovu stabilnost što je poželjno za neke proizvode (O'Sullivan i sur., 2016). Kao predtretman, ultrazvuk je pogodan u proizvodnji glutena iz pšenice jer poboljšava proces ekstrakcije, a dobiveni gluten može se koristiti kao funkcionalni dodatak u hrani (Qin i sur., 2017).

Ultrazvuk je moguće primijeniti i u ekstrakciji hemiceluloze iz pšenične slame čime se povećava prinos procesa, a izolirana hemiceluloza ima malo manju molekulsku masu, vezane lignine te je termostabilnija od one klasično izolirane. Glavna struktura hemiceluloze nije znatno promijenjena čime je ultrazvuk pogodan za ekstrakciju (Sun i sur., 2002). Pšenična pljeva sadrži visoki udio ksilooligosaharida koji imaju antioksidacijska i prebiotička svojstva, a predtretman ultrazvukom u procesu ekstrakcije može poslužiti kao zamjena za enzimsku hidrolizu te time smanjuje uporabu kemijskih sredstava koja imaju negativan utjecaj na okoliš (Antov i Đorđević, 2017).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

Za provedbu ovog istraživanja korištene su pšenične posije proizvođača Farina (Granolio d.d., Hrvatska) te bijelo pšenično brašno T-500 (Mlin Katić d.o.o., Slovenija). Kemijski sastav pšeničnih posija (Antolić, 2017) te specifikacije brašna (Mutak, 2018) već su prethodno istraženi i definirani. U ovom radu su korišteni nativni uzorak dobiven iz industrijskog mlina te uzorak usitnjen na ultra-centrifugalnom mlinu ZM 200 (Retsch) sa sitom veličine otvora 200  $\mu\text{m}$ . U svim smjesama brašna i pšeničnih posija primijenio se omjer 80:20 u korist brašna, uzevši u obzir udio vlage u uzorcima.

Općenito za tretman ultrazvukom visokog intenziteta korištena je skraćenica UVI. Za netretirane uzorke koristila se oznaka NATIVNE, za one grijane istom kinetikom rasta temperature kao i kod ultrazvuka, koristila se oznaka GRIJANO, a za one hladene tijekom tretmana ultrazvuka koristila se kratica UVI + LED.

#### Reagensi:

- 1) 95 %-tni etanol (Kefo, Hrvatska)
- 2) 78 %-tni (v/v) etanol
- 3) Aceton, pro analysi (Gram-mol, Hrvatska)
- 4) Enzimi (Megazyme International, Irska):
  - pankreasna  $\alpha$ -amilaza (E-BLAAM); 3000 Ceralpha Units  $\text{ml}^{-1}$
  - proteaza (E-BSPRT); 50  $\text{mg ml}^{-1}$ ; 350 Tyrosine Units  $\text{ml}^{-1}$
  - amiloglukozidaza (E-AMGDF); 200 pNP  $\beta$ -maltoside Units  $\text{ml}^{-1}$  (ili 3,300 Units  $\text{ml}^{-1}$ )
- 5) Destilirana voda
- 6) Celit (filtracijsko sredstvo, dijatomejska zemlja) (Megazyme, Irska)
- 7) 50 mM otopina natrij-maleatnog pufera; pH 6,0 s 2 mM  $\text{CaCl}_2$
- 8) Smole za deionizaciju: Amberlite 200H+ i FPA53 (Rohm and Haas, Francuska)
- 9) Trizma Base (Sigma cat. no. T-1503); 0,75 M
- 10) 2 M otopina octene kiseline, (Priprema: iz ledene octene kiseline, 99,5 %, Macron)
- 11) D-sorbitol (interni standard), Megazyme kit
- 12) 40% NaOH (T.T.T. d.o.o., Hrvatska)
- 13) 5 %-tna (m/v) otopina NaOH

- 14) 6,0 M otopina NaOH
- 15) 0,05 M otopina NaOH
- 16) Otopina MES-TRIS pufera - svaki 0,05 M; pH 8,2 pri 24 °C
- 17) 37 %-tna otopina HCl (Panreac Quimica SLU, Španjolska)
- 18) 0,561 M otopina HCl
- 19) 5 %-tna otopina HCl
- 20) Otopina za pranje filter lončića, Labex
- 21) Reagensi za određivanje SDFS – mobilna faza
- 22) Konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (Carlo Erba Reagents, Francuska)
- 23) 4% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Gram-mol, Hrvatska)
- 24) Katalizator: Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selena) (Merck KGaA, Njemačka)
- 25) HCl, 0,1 M titrival (Kefo, Hrvatska)
- 26) 3 % fenolftalein (Gram-mol, Hrvatska)
- 27) 0,1 M natrij-fosfatni pufer (pH 5,0)
- 28) 0,1 M acetatni pufer (pH 5,3)
- 29) 9,1 mM ABTS (Sigma)
- 30) 0,3 %-tni (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 31) L-DOPA (L-dihidroksifenilalanin), 10 mM (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- 32) Tween-20 (Polioksietilensorbitanmonolaurat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 33) MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonskakiselina), 50 mM, pH=6,5 (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- 34) Biljno ulje, Budget repičino ulje (Spar, Hrvatska)
- 35) Kuhinjska sol (Paška solana, Hrvatska)
- 36) Kvasac, instant (Digo, Hrvatska)

Aparatura i pribor:

1. Staklene čaše
2. Staklena menzure
3. Erlenmeyer-ove tikvice
4. Odmjerne tikvice
5. Petrijeve zdjelice
6. Plastične posude (urinarke)
7. Laboratorijske boce
8. Laboratorijska žlica

9. Špatula
10. Mikropipete (50 - 200  $\mu\text{m}$  i 5 ml) i nastavci, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
11. 25 mL birete (graduacija = 0,1 mL)
12. 10 mL dispenzeta za konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$
13. 25 mL dispenzeta za  $\text{H}_3\text{BO}_3$
14. Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
15. Metalna zdjelica
16. Analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g (Kern&Sohn GmbH ALS 220-4N, Balingen, Njemačka)
17. Posudice za vaganje
18. Termometar
19. Vortex miješalica (Vortex 4 basic, IKA, Njemačka)
20. Magnetska miješalica, IKA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
21. Štoperica
22. Vodena kupelj s tresilicom (SBS40, Stuart, UK)
23. Sušionik ST-01/02, Instrumentaria
24. Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
25. Stakleni filter lončići (50 mL, veličina pora 40 - 60  $\mu\text{m}$ )
26. Boca za odsisavanje, 500 mL
27. Stakleni lijevak za filtraciju
28. Gumeni prsten
29. Izvor vakuuma
30. pH metar, JENWAY 3510 (UK)
31. Ubodni pH metar s termometrom (Testo 206, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Njemačka)
32. Syringe filteri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (LAB-EX Labortrading LTD., Mađarska)
33. HPLC uređaj, Shimadzu
34. Kolone za odsoljavanje
35. Mufolna peć s regulatorom temperature KR170 (W. C. Heraeus, Njemačka)
36. Laboratorijska kliješta
37. Nonius (Metal kovis, Hrvatska)
38. Plastični podložak
39. Parafilm
40. Uređaj za mineralizaciju (Tecator)
41. Kjeltex™8100 (Foss, Njemačka)

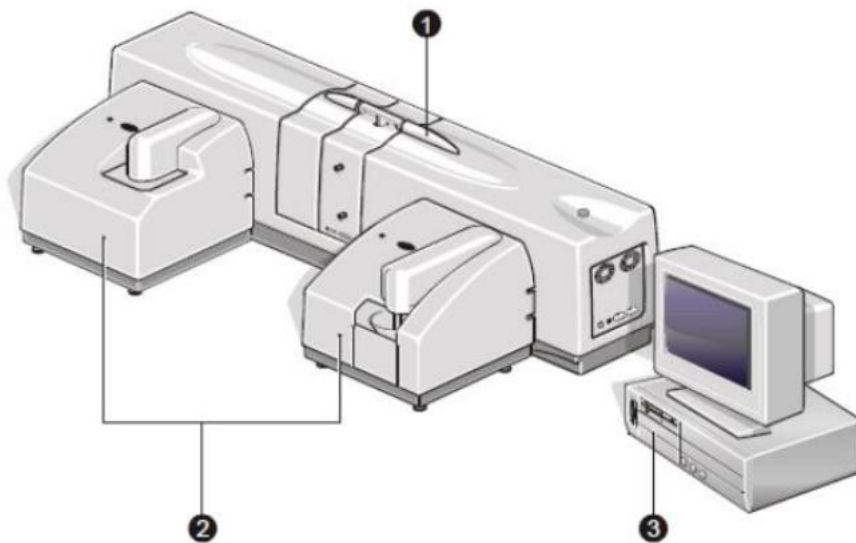
42. Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju sa stalkom
43. Učinkoviti sustav za odvod pare: aspirator ili pročistač plina ili tekuća voda
44. Rotavapor (Hei-VAP Core, Heidolph, Njemačka)
45. Ultrazvučni procesor dr. Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s (Njemačka) snage 400 W, sa sondom promjera 22 mm
46. Kolorimetar (Konica Minolta, Sensing, CM – 700d, CM – A177, Japan)
47. Ultra-centrifugalni mlin ZM 200 (Retsch, Njemačka) sa sitom veličine otvora 200 µm
48. Malvern 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Velika Britanija)
49. Liofilizator Christ Alpha 1-4 LSC plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka)
50. GlutoPeak (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Njemačka) s jedinicom za hlađenje (Julabo Inc, PA, USA)
51. Rotacijski viskozimetar, Micro Visco-Amylo-Graph (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Njemačka)
52. Centrifuga Rotina 35 (Hettich, Njemačka)
53. Spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
54. Analizator teksture TA.HDplus (Stable Micro Systems, Velika Britanija)
55. Probno pečenje se provelo u laboratorijskoj pekari PBF-a koja se sastoji od:
  - a. Mjesilica tijesta, Diosna SP12, Njemačka
  - b. Fermentacijska komora, Weisheu, Njemačka
  - c. Djelilica tijesta
  - d. Pekarska etažna peć, Weisheu, Njemačka
  - e. Uređaj za brzo smrzavanje, Everlasting, SAD
  - f. Stroj za rezanje kruha, Gorenje, Slovenija

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Usitnjavanje i određivanje raspodjele veličine čestica posija**

Mljevenje na ultra-centrifugalnom mlinu provelo se laganim usipavanjem posija u usipni koš u obrocima po 100 g uzorka. Raspodjela veličina čestica pšeničnih posija, nativnih i mljevenih na ultra-centrifugalnom mlinu, određena je laserskim analizatorom veličine čestica

Malvern 2000 (slika 4), koji je opremljen jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 i povezan računalom s Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60. Prije pokretanja procesa, uređaj je kalibriran, a zatim su analizirani uzorci. U kadicu jedinice za suhu disperziju je usipan uzorak, a kadica je opremljena sitom za razbijanje aglomerata i ujednačavanje dotoka uzorka u mjernu ćeliju. Zasićenje laserske zrake je podešeno na 2 - 6 % (Benković i sur., 2013), a za svaki od uzoraka provedena su tri paralelna mjerenja. Brzina dovoda uzorka u ćeliju i tlak zraka prilagođavani su tijekom mjerenja kako bi održali konstantnost zasićenja laserske zrake (Benković, 2013).



**Slika 4.** Uređaj Mastersizer 2000 (1. Optička klupica, 2. Jedinica/e za disperziju uzoraka, 3. Softver) (Malvern Instruments Ltd., 2007).

Rezultati su izražavani kao percentili raspodjele veličine čestica:

- $d(0,5)$  označava promjer čestica za koji vrijedi da je 50 % ukupnog broja čestica veći od tog promjera, a drugih 50 % manji od tog promjera [ $\mu\text{m}$ ]
- $d(0,1)$  označava veličinu čestice od koje je manje 10 % čestica cijelog uzorka [ $\mu\text{m}$ ]
- $d(0,9)$  označava veličinu čestica od koje je manje 90 % čestica cijelog uzorka [ $\mu\text{m}$ ]
- $D[3,2]$  predstavlja površinski ekvivalentni promjer, odnosno Sauterov promjer [ $\mu\text{m}$ ]

Raspon (span) predstavlja širinu raspodjele čestica i računa se prema formuli:

$$Raspon = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad [1]$$

### 3.2.2. Određivanje udjela vode i suhe tvari

Količina vode u pšeničnim posijama određena je metodom koja je definirana 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.

Postupak rada:

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvagano je  $2 \pm 0,0005$  g uzorka. Otvorena zdjelica s uzorkom i poklopcem stavljena je u sušionik zagrijan na  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 90 minuta. Nakon sušenja zdjelica je izvađena iz sušionika, pokrila poklopcem te je stavljena hladiti u eksikator, a nakon hlađenja je izvagana. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu, a kao rezultat uzeta je srednja vrijednost. Količina vode u uzorku prikazana je u postocima, a izračunata je prema formuli:

$$\text{Udio vode (\%)} = \frac{(m_0 - m_1) \cdot 100}{m_0} \quad [2]$$

gdje su:

$m_0$  = masa uzorka [g]

$m_1$  = masa uzorka nakon sušenja [g]

Dobiveni podaci o količini vode u uzorku korišteni su za izračun udjela količine suhe tvari, koji se prikazuje u postocima, a izračunata je prema formuli:

$$\text{Suha tvar (\%)} = 100\% - \text{udio vode (\%)} \quad [3]$$

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

Postupak rada:

Priprema lončića za upotrebu: Lončići su stavljeni u mufolnu peć na  $525\text{ }^{\circ}\text{C}$  preko noći. Celit i pepeo odstranjeni su uporabom vakuuma. Lončići su potopljeni u otopini za mikročišćenje na sobnoj temperaturi 1 h, a ispirani su vodovodnom i destiliranom vodom. Za zadnje ispiranje

korišteno je 15 mL acetona i lončići su ostavljeni da se osuše na zraku. U posušene lončiće dodano je 1 g celita te su stavljeni u sušionik na 130 °C da se osuše do konstantne mase. Lončići su hlađeni u eksikatoru oko 1 h nakon čega su izvagani.

Priprema uzoraka: Odvagano je  $1,000 \pm 0,005$  g uzorka u duplikatu u 250 mL Duran boce s čepom. Uzorak je navlažen s 1 mL 95 %-tnog etanola. Dodano je 40 mL maleatnog pufera (pH 6,0) koji sadrži pankreasnu  $\alpha$ -amilazu i aminoglukozidazu. Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji s tresilicom (nakošeni pod kutom od 45°, ali ne nužno) na 37°C točno 16 sati, pod brzinom trešnje  $120 \text{ o min}^{-1}$ . Nakon toga dodano je 3,0 mL 0,75 M trizma bazične otopine (konačni pH 8,2). Boce s malo olabavljenim čepom stavljene su u (drugu) kupelj na 95-100 °C na 20 minuta, pri čemu je temperatura provjeravana termometrom (temperatura u boci treba biti  $> 90^\circ\text{C}$ ). Boce se povremeno protreslo rukom. Uzorci su ohlađeni na 60 °C, pri čemu je temperatura provjeravana uranjanjem termometra. Zatim je dodano 100  $\mu\text{L}$  otopine proteaze i inkubirano na 60 °C 30 minuta, uz trešnju. Nakon što su boce izvađene iz kupelji, odmah je dodano 4,0 mL 2 M octene kiseline (konačni pH 4,3) i 1 mL internog standarda (D-sorbitol,  $c = 100 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

### 3.2.3.1. *Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana*

Za netopljiva vlakna, prethodno osušen i izvagan lončić s celitom je namočen s otprilike 15 mL 78%-tnog etanola pomoću boce štrcaljke, zatim je poravnan i posušen pod vakuumom da bude mat. Potom je otopina uzorka i enzima profiltrirana te isprana (Duran boca i ostatak) sedam puta s po 5 mL destilirane vode zagrijane na 60 °C. Sakupljenom filtratu podešen je volumen na 85 mL i sačuvan za određivanje topljivih vlakana. Ostatak na lončiću ispran je s dva obroka od 15 mL sljedećeg: 78 %-tni etanol, 95%-tni etanol i aceton. Filtrat od ispiranja je bačen, a lončići osušeni na 105 °C preko noći i nakon hlađenja izvagani. Masa taloga izračunata je na način da je oduzeta masa lončića i celita od mase osušenog lončića i celita s uzorkom. Za izračun netopljivih vlakana velike molekulske mase (IDF) bilo je potrebno odrediti količinu pepela (metoda je opisana u poglavlju 3.2.3.4). i količinu proteina (metoda je opisana u poglavlju 3.2.3.5.).

### 3.2.3.2. *Određivanje topljivih prehrambenih vlakana*

Za određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) potrebno je bilo 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 taložila se na sobnoj temperaturi 60 minuta. Nakon taloženja uzorak je filtriran pod vakuumom kroz prethodno osušene i izvagane lončice s celitom. Prvo je celit bio namočen s otprilike 15 mL 78 %-tnog etanola pomoću boce štrcaljke, poravnat i osušen pod vakuumom da bude mat. Uzorak je profiltriran kroz lončić, s tim da je sadržaj boce kvantitativno prenesen preko lončića s 78 %-tnim etanolom (sedam puta po 5 mL). Ostatak na lončiću ispran je s dva obroka od 15 mL sljedećeg: 78 %-tni etanol, 95 %-tni etanol i aceton te je sušen preko noći na 105 °C. Filtrat je sačuvan za određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS). Nakon sušenja ohlađeni lončić s ostatkom je izvagan. U jednom ostatku određen je udio proteina po Kjeldahlu ( $f = 6,25$ ), a u drugom paralelnom ostatku određen je udio pepela spaljivanjem na 525 °C tokom 5 h. Ostatak korigiran za udio proteina i pepela predstavlja netopljiva i topljiva vlakna velike molekulske mase (HMWDF).

### 3.2.3.3. *Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS)*

Za određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS) polovina oba filtrata prenijeta je u tikvicu za otparavanje od 500 mL (svaki zasebno) i otparena do suha na rotavaporu pod vakuumom na 60 °C. Tikvica je isprana s 5 mL destilirane vode i okretana oko 2 min dok se sve nije otopilo (otopina se prenese u polipropilensku bočicu s čepom od 20 mL, ukoliko se ostavlja do drugog dana za daljnju analizu). Potom je uzorak bilo potrebno deionizirati tako da je 2 mL otopine prenijeto na kolonu za deionizaciju s kationskim i anionskim (Amberlite i Ambersep) smolama dobro izmiješanim neposredno prije primjene. Na koloni je eluirano brzinom 1 mL min<sup>-1</sup> (~1 kap u 3 sekunde). Protok je prilagođen laganim zakretanjem ventila kolone. Eluat je sakupljen u okruglu tikvicu od 250 mL za rotavapor (ili Falcon epruvetu od 50 mL smještenu u kadicu manifolda). Kad je uzorak ušao među smole, dodano je 2 mL deionizirane vode na vrh kolone. Nakon što je to prošlo kroz kolonu, dodano je još ~20 mL deionizirane vode na vrh kolone i eluirano istom brzinom. Potom je eluat uparen do suha na rotavaporu na 60 °C. U tikvicu je dodano 2 mL destilirane vode i okretano 2 min kako bi se otopili šećeri. Otopina je pipetom prenijeta u polipropilensku posudu za čuvanje do analize.



Potom je otopina filtrirana špricom preko 0,45 um filtera. Tako pripremljen uzorak injektira se u HPLC s RI detektorom. Mobilnu fazu činila je otopina Na<sub>2</sub>Ca-EDTA u vodi (50 mg L<sup>-1</sup>), s protokom 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Kolona je grijana na temperaturu od 80 °C. Vrijeme propuštanja uzorka kroz kolonu bilo je 30 min. Za kvantifikaciju je bilo potrebno kroz HPLC propustiti i otopine glukoze koncentracije 5, 10 i 20 mg mL<sup>-1</sup> (tri puta). Propušten je i interni standard (D-sorbitol, 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, tri puta) te standardi za utvrđivanje retencijskih vremena (maltoza i maltodekstrini) koji su sadržani u enzimskom setu. Određeno je vrijeme razgraničenja između maltoze (disaharid, DP 2) i oligosaharida (DP 3). Nakon toga je određena površina svih pikova sa stupnjem polimerizacije većim od točke razgraničenja za DP2/DP3. Ukupan zbroj predstavljao je SDFS.

#### 3.2.3.4. Određivanje količine pepela

Metoda za određivanje pepela modificirana je i rađena prema protokolu opisanom u metodi za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana - AACC 32 - 05.01 te AACC 32 - 21.01 metodi za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana (Megazyme International Ireland, 2017).

Postupak rada:

Lončići za određivanje prehrambenih vlakana su stavljeni u hladnu mufolnu peć te su spaljivani 5 sati nakon postizanja odgovarajuće temperature od 525 °C +/- 20 °C. Lončići su ohlađeni u eksikatoru te im je izvagana masa. Izgaranje uzorka se smatra završenim kad je ohlađeni uzorak bijele boje. Nakon izgaranja, posuda je hlađena u eksikatoru do sobne temperature. Nakon hlađenja, uzorak je brzo izvagan. Količina pepela izračunata je pomoću mase uzorka, udjela vode u njemu te mase ostatka prema formuli:

$$\text{Količina pepela (\%)} = m_1 \cdot \frac{100}{m_0} \cdot \frac{100}{100-v} \quad [4]$$

gdje su:

$m_0$  = masa ispitanog uzorka [g]

$m_1$  = masa ostatka [g]

v = količina vode u ispitanom uzorku [%]

### 3.2.3.5. *Određivanje udjela 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.

Postupak rada:

U Tecator kivete metodom dvostrukog vaganja stavljen je uzorak vlakna. U svaku kivetu dodana je 1 tableta Kjeldahl katalizatora i 12 mL koncentrirane sulfatne kiseline te lagano miješana dok se uzorak potpuno navlažio kiselinom. Nakon toga je stalak s epruветama stavljen u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključen je sistem za odvod pare. Mineralizacija je završena nakon otprilike 60 minuta, a tekućina u epruветama je bistra i svijetlozelene boje. Epruвете sa stalkom su izvađene iz digestijske jedinice i ostavljene da se ohlade do sobne temperature zajedno s poklopcem. Nakon hlađenja u svaku epruветu je stavljeno 80 mL destilirane vode. Za vrijeme trajanja mineralizacije za svaki uzorak pripremljena je jedna Erlenmeyer tikvica od 250 mL te je u njih stavljeno 25 mL borne kiseline i 3 kapi indikatora. Uključen je aparat za destilaciju, voda puštena da se napuni generator pare (ventil ispuštanja vode mora biti zatvoren) te je na postolje predviđeno za prihvatnu tikvicu stavljena prazna tikvica, a na mjesto predviđeno za Kjeldahlovu kivetu prazna kiveta te je pokrenut generator pare. Nakon što je u prihvatnu tikvicu skupljen kondenzat, otvorena su zaštitna vratašca Kjeltec uređaja te je prihvatna tikvica zamijenjena tikvicom u koju je stavljeno 25 mL borne kiseline (destilacijska cjevčica mora biti uronjena u otopinu), a Kjeldahlova kiveta kivetom u koju je stavljen spaljeni uzorak s 80 mL destilirane vode te su ponovno zatvorena vratašca. Dozirano je 50 mL 40 %-tnog NaOH u Kjeldahlovu kivetu i pokrenuta je destilacija trajanja oko 4 minute (do volumena 125 mL). Dobiveni destilat bio je zelene boje (indikator prisustva amonijaka) koji mora biti hladan jer u protivnom dolazi do gubitka amonijaka. Nakon završetka destilacije, Kjeldahlova kiveta je ispražnjena u izljev uz puštanje hladne vode, a destilat titriran kloridnom kiselinom te je zabilježen utrošak. Ta titracija provedena je pomoću birete koja je napunjena 0,1 M HCl-om, a provedena je izravno u prihvatnu tikvicu. Titracija je bila završena kada se boja otopine promijenila u blijedo ružičastu (Novak, 2017). Udio dušika i udio proteina izračunati su na sljedeći način:

$$\%N = \frac{\{(a-b) \cdot M_{kis.} \cdot f_{kis.} \cdot 1,4007\}}{m_{uzorak}} \quad [5]$$

gdje su:

a = volumen HCl utrošen za titraciju uzorka [mL]

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

M = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

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

$$\% \textit{ proteina} = \%N \cdot F \quad [6]$$

gdje je:

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

### 3.2.4. Ultrazvučna obrada posija

Postupak rada:

Pripremljena je 15 i 30 %-tna suspenzija pšeničnih posija na način da je u staklenu čašu od 250 mL odvagano 15 ili 30 g uzorka pšeničnih posija te je dodano 100 mL destilirane vode. Pripremljena suspenzija je dobro promiješana staklenim štapićem. Uzorci su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta na uređaju dr. Hielscher GmbH, Ultraschallprozessor UP 400s sa sondom promjera 22 mm. Snaga ultrazvuka iznosila je 400 W i frekvencija 24 kHz uz amplitudu 80 % u trajanju od 15 minuta. Uzorak 15 ili 30 %-tne suspenzije pšeničnih posija stavljen je na postolje u izoliranoj komori tako da je sonda ultrazvuka bila uronjena u uzorak oko 3 cm. Na generatoru zvuka namještene su postavke tretmana, amplituda zvučnog vala i način rada (ciklus), te je uključen generator zvuka. Pripremljene 15 i 30 %-tne suspenzije pšeničnih posija tretirane su 15 minuta. Također je pripremljen uzorak koji je hlađen u ledenoj kupelji za vrijeme tretmana ultrazvukom (oznaka UVI + LED). Radi bolje procjene utjecaja ultrazvuka visokog intenziteta na sastav pšeničnih posija i tehnološka svojstva, pripremljen je i kontrolni uzorak 15 i 30 %-tne suspenzije pšeničnih posija kod kojeg nije proveden tretman

ultrazvukom visokog intenziteta. Svi ostali postupci analize na tom uzorku provedeni su kao i kod ostalih uzoraka koji su tretirani ultrazvukom visokog intenziteta. Prilikom tretmana ultrazvukom, praćena je kinetika rasta temperature u uzorku. Kasnije je za pripremu konvencionalno grijanih uzoraka ('GRIJANO') na magnetskoj miješalici oponašana ta kinetika rasta temperature kako bi se usporedio utjecaj topline.

#### 3.2.4.1. *Liofilizacija*

Nakon tretmana UVI, svaki uzorak je dekantiran u plastične posudice u debljini sloja 1-2 cm te smrznut na -20 °C do početka liofilizacije. Uzorci su prije liofilizacije dodatno smrznuti na -80 °C tijekom 24 h. Sam proces liofilizacije trajao je 43 h, odnosno dok temperatura uzorka nije postigla sobnu temperaturu. Osušeni uzorak je homogeniziran na način da je najprije jako dobro izmiješan sa staklenim štapićem unutar jedne plastične posudice, a zatim su pomiješani isti uzorci iz različitih plastičnih posudica u jednu veću plastičnu posudu te kao takvi korišteni za ekstrakciju. Osušenim uzorcima zatim je određen udio vode za potrebe korekcije daljnjih analiza.

#### 3.2.5. *Određivanje enzimске aktivnosti*

Kako bi se odredio utjecaj djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta na enzimsku aktivnost pšeničnih posija, u ovom radu je određena aktivnost tri enzima: polifenol oksidaze, peroksidaze te lipaze, odnosno određen je njihov postotak inaktivacije u odnosu na nativni uzorak netretiranih pšeničnih posija.

##### 3.2.5.1. *Polifenol oksidaza*

Aktivnost enzima polifenol oksidaza određena je prema standardnoj metodi AACC 22-85.01. Otopljeno je 1,031 g MOPS-a u 100 mL 1 M NaOH u laboratorijskoj čaši. pH vrijednost je regulirana postupnim dodavanjem destilirane vode i NaOH, a nakon postignutog pH 6,5 sadržaj je kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu. Otopljeno je 98,595 g L-DOPA reagensa u 50 mL 50 mM MOPS-a. U odmjernu tikvicu dodani su L-DOPA i MOPS reagensi te 0,02 %

Tween-20. Otopina je promućkana te ostavljena 45 min kako bi se otopili svi kristali L-DOPA-e. Za to vrijeme čekanja izvagano je 50 mg svakog uzorka u mikroeprovete od 2 mL. U epruvete s uzorkom dodano je 1,5 mL pripremljene otopine nakon što su se otopili svi kristali. Kao slijepa proba analizirano je samo 1,5 mL otopine, bez uzorka. Epruvete su miješane 55 minuta na vortex miješalici nakon čega su centrifugirane 5 minuta na maksimalnoj brzini od 14000  $\text{min}^{-1}$ . Za mjerenje apsorbancije otpipetirano je 1 mL otopine u mikrokivete. Na spektrofotometru je izmjerena apsorbancija pri 475 nm.

#### 3.2.5.2. *Peroksidaza*

U određivanju aktivnosti peroksidaze, korištena je kolorimetrijska metoda s ABTS-om kao supstratom koju je primijenio Poudel i sur. (2018) prema De Almeida i sur. (2014). U epruvetu je izvagano 0,125 g svakog uzorka (za svaki uzorak provedena su tri mjerenja) koji je otopljen u 2,5 mL 0,1 M natrij-fosfatnog pufera (pH 5,0) nakon čeka su svi uzorci stavljeni na vortex miješalicu ( $150 \text{ min}^{-1}$ ) 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim su 10 minuta centrifugirani na 538 x g. Supernatant je odvojen od taloga te korišten za daljnju analizu. U novu epruvetu dodano je: 2,9 mL 9,1 mM ABTS-a, 0,1 mL 0,3 %-tnog (w/w) hidrogenperoksida te 0,05 mL supernatanta uzorka (u slijepu probu dodan je pufer umjesto uzorka). Zatim je mjerena apsorbancija uzoraka pri 405 nm na spektrofotometru tijekom 3 min, a vrijednost apsorbancije očitavana je svakih 30 sekundi. Jedinica aktivnosti peroksidaze definirana je kao količina enzima koja oksidira 1,0  $\mu\text{mol}$  ABTS-a u jednoj minuti pri pH 5,0 i 25 °C.

#### 3.2.5.3. *Lipaza*

Lipolitička aktivnost određena je titrimetrijskom metodom kako ju navodi Piechowiak i sur. (2018). Izvagano je  $5 \pm 0,01$  g uzorka u koji je dodano 147 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 5,3), a nakon sat vremena miješanja na vortex miješalici, centrifugirano je 15 min na 8000  $\text{min}^{-1}$ . Dobiveni supernatant je odvojen te korišten kao ekstrakt za analizu. U posebnu epruvetu su dodani: 2,5 mL biljnog ulja, 0,5 mL Tween 20, 1 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 5,3) te je sve jako promiješano na vortex miješalici. Zatim je inkubirano u termostatnoj kupelji 10 min na 40 °C, a nakon toga je dodano 2 mL ekstrakta uzorka nakon čega je opet sve promiješano.

Sve pripremljene smjese su inkubirane 1 h na 40 °C nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 4 mL 96 %-tnog etanola. Nakon toga su uzorci kvantitativno prenijeti u Erlenmeyerove tikvice te titrirani 0,05 M otopinom NaOH uz dodatak fenolftaleina kao indikatora. Uzorak slijepa probe je analiziran na isti način uz iznimku da nije dodan ekstrakt uzorka. Aktivnost lipaze izražena je kao količina masnih kiselina nastalih hidrolizom iz 1 g uzorka u 1 min.

### 3.2.6. Određivanje tehnoloških svojstava smjese brašna i posija

U cilju određivanja tehnoloških svojstava pšeničnih posija u smjesi s bijelim brašnom (20 g posija na 80 g brašna), korištene su dvije metode: GlutoPeak za agregaciju glutena te mikroviskoamilograf (MVA, *eng.* Micro Visco-Amylo-Graph,) za želatinizirajuća svojstva škroba.

#### 3.2.6.1. *Određivanje kinetike agregacije glutena*

Prema Wang i suradnicima (2018), za analizu utjecaja pšeničnih posija na agregaciju glutena u matrici brašna korišten je uređaj GlutoPeak s jedinicom za hlađenje. Uzorci pšeničnih posija, brašna i kalcijevog klorida (količina dodane otopine koncentracije 0,5 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> je korigirana prema vlazi uzorka u programu samog uređaja) izvagani su svaki odvojeno te pomiješani u posudici za analizu neposredno prije mjerenja. Smjesa je miješana u uređaju 3 minute pri 20 °C uz brzinu 3000 o min<sup>-1</sup>. Omjer brašna s posijama i CaCl<sub>2</sub> bio je 8 g:10 g. Za analizu agregacije glutena, promatrani su: maksimalna torzija, maksimalno vrijeme te energija agregacije. Mjerenje je provedeno dva puta za svaki uzorak.

#### 3.2.6.2. *Svojstva želatinizacije škroba na mikroviskoamilografu*

Za određivanje viskoznosti uzoraka, odnosno želatinizirajućih svojstava suspenzije vode i brašna, primijenjena je standardna metoda ICC 162 (1996) uz korekciju dodane vode prema vlazi uzorka (ukupno 10 g u 105 ml vode). Uzorci su izvagani odvojeno te pomiješani u posudici za analizu netom prije mjerenja. Mjerenje je provedeno u mikroviskoamilografu.

Analiza je provedena u slijedećim uvjetima: početna temperatura 30 °C, zagrijavanje do 95 °C brzinom 7,5 °C min<sup>-1</sup>, zadržavanje temperature 5 min, hlađenje do 50 °C brzinom 7,5 °C min<sup>-1</sup>, te održavanje temperature 1 min, 250 o min<sup>-1</sup>, mjerno područje 100 cmg. Rezultati uzorka su srednja vrijednost dva paralelna mjerenja. Dobiveni podaci izraženi su Brabenderovim jedinicama (*hrv.* BJ, *eng.* BU) za viskoznost uz pomoć kompjuterskog programa Brabender Viscograph Data Corelation za Windowse, a analizirani su maksimalna viskoznost, viskoznost na kraju perioda hlađenja te povratna viskoznost. Maksimalna viskoznost predstavlja najveću želatinizaciju škroba, odnosno kapacitet uzorka (brašna ili smjese brašna i posija) za vezanje vode. Viskoznost na kraju perioda hlađenja odnosi se na ohlađeni želatinizirani škrob, dok je povratna viskoznost ona koju uzrokuje retrogradacija amiloze u škrobu (Sopade i sur., 2006).

### 3.2.7. Postupak pripreme tijesta i kruha s dodatkom posija

Pripremljen je zamjes prema recepturi u tablici 1.

**Tablica 1.** Receptura krušnog tijesta.

Sastojci	ukupno 1308,34 g
<b>Brašno, pšenično bijelo (Mlin Katić)</b>	608 g
<b>Pšenične posije</b>	147,1 g
<b>Voda, vodovodna</b>	533,5 mL
<b>Sol, kuhinjska</b>	13,7 g
<b>Kvasac, instant</b>	6,1 g

Postupak pripreme:

Svi sastojci dodani su u spiralnu miješalicu te miješani 3 min sporo, a zatim 5 min brzo. Tijesto je odmarano u masi 10 min, a zatim razdijeljeno na dio za određivanje teksture tijesta te dio za pečenje kruha. Svaki taj dio je razdijeljen na pola, dio za direktne analize, a dio za odgođenu fermentaciju. Za odgođenu fermentaciju, tijesto je zamotano u plastičnu foliju i stavljeno na hlađenje prvo u uređaj za brzo smrzavanje (oko 1 h dok temperatura nije pala na 1

°C), a zatim je čuvano u hladnjaku na 0 °C tijekom 24 h, odnosno 48 h. Dio tijesta koji je bio za direktnu analizu, prvo je analiziran na uređaju za određivanje boje tijesta, a zatim na analizatoru teksture. Nakon toga tijesto je fermentiralo oko 1 h te pečeno 18 min na 230 °C uz dodatak 130 mL vode u pećnici. Nakon pečenja, kruh se hladio 1 h na sobnim uvjetima. Zatim su određeni boja, volumen te tvrdoća sredine kruha. Radi usporedbe, pripremljeno je tijesto s netretiranim pšeničnim posijama te s 30 %-tnom suspenzijom tretiranih posija pri optimalnim uvjetima ultrazvuka.

### 3.2.8. Određivanje reoloških svojstava krušnog tijesta s dodatkom posija

Za određivanje teksture tijesta (kasnije u radu i samog kruha) korišten je analizator teksture (slika 5) s 25 kg mjernom ćelijom i aluminijskom sondom 50 mm, uz računalni program Texture Exponent 32 za obradu rezultata mjerenja.



**Slika 5.** Analizator teksture TA.HDplus (Stable Micro Systems Ltd, 2009).

Na početku mjerenja provedena je kalibracija uređaja s podloškom bez uzorka. Zatim je uzorak tijesta razvaljan na podlošku do debljine 10 mm te je prekriven parafilmom. Za mjerenje parametara teksture sredine kruha parametri uređaja bili su: brzina pritiska  $1 \text{ mm s}^{-1}$  i dubina prodiranja 12,5 mm uz pauzu između dva mjerenja od 75 sekundi. Grafički rezultati mjerenja obrađeni su pomoću računalnog programa Texture Exponent 32 koji je izračunao srednje



vrijednosti i standardna devijacija mjerenja za svaki pojedini uzorak. Prema Armero i Collar (1997) analiziraju se sljedeći parametri:

- Tvrdoća („hardness“): sila potrebna za deformaciju tijesta pri prvoj kompresiji;
- Elastičnost („springiness“): stupanj u kojem se deformirano tijesto vraća u prvotni položaj nakon uklanjanja djelovanje sile;
- Kohezivnost („cohesivness“): jačina unutarnjih veza, odnosno stupanj potrebne sila za drugu kompresiju (stupanj deformacije kod stiskanja tijesta);
- Gumenost („gumminess“): kombinacija tvrdoće i kohezivnosti;
- Rezilijencija („resilience“): sposobnost vraćanja tijesta u prvotni oblik.

### 3.2.7. Određivanje parametara boje tijesta i sredine kruha

Određivanje parametara boje uzoraka provedeno je difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru, pri čemu su dobivene  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti, a njihovi nelinearni odnosi predstavljaju imitaciju logaritamskog odgovora ljudskog oka (CIE, 2004). Ljudsko oko ima receptore za kratke (S), srednje (M) i duge (L) valne duljine koji su poznati kao plavi, zeleni i crveni receptori.  $L^*$  vrijednost predstavlja osvjetljenje ili svjetlosnu komponentu, 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). Prije mjerenja provedena je kalibracija uređaja s čisto bijelim standardom (100 %-tna refleksija), te crnim valjkom (0 % refleksije). Za potrebe analize, uzorci tijesta s pšeničnim posijama (nativnim i tretiranim ultrazvukom) prenijeti su u petrijeve zdjelice promjera 10 cm na način da uzorak tijesta prijanja uz dno te da je promjer uzorka veći od promjera otvora na uređaju. Područje mjerenja podešeno je na 400 do 700 nm, što odgovara vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Mjerenja su provedena korištenjem računalne aplikacije SpectraMagic NX u SCI („Specular Component Included“) modu, a on predstavlja način mjerenja boje uzorka pri kojem se uzorak prikazuje kako ga vidi ljudsko oko, odnosno uračunavaju se sjene. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 8 mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom.

Mjerenja boje sredine kruha provedena su na sličan način kao i za tijesta, ali je promijenjena veličina otvora uređaja na 20 mm te su za jedno mjerenje korištene dvije šnite kruha bez kore (debljine 12,5 mm).

### 3.2.8. Svojstva kvalitete kruha

Uzorci pečenih i ohlađenih kruhova nakon sat vremena izvagani su na laboratorijskoj vagi. Volumen kruha određen je uranjanjem kruha u kalibriranu posudu u kojoj su se nalazile sjemenke uljne repice prema metodi AACC metodi 10-05.01. Volumen istisnute količine sjemenki uljne repice izmjeren je menzutom što je odgovaralo volumenu kruha. Specifični volumen kruha ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) izračunat je kao omjer volumena i mase kruha na 5 paralelnih mjerenja.

Oblik kruha određen je pomoću pomičnog mjerila nonius na način da su izmjereni visina i promjer kruha na najvišem, odnosno najširem djelu, te je visina u centimetrima podijeljena s promjerom u centimetrima. Mjerenja su ponovljena na 5 paralelnih uzoraka. Oblik kruha izračunat je kao omjer visine i širine kruha.

Nakon specifičnog volumena, oblika i boje kruha, određena je tekstura sredine prema standardnoj metodi AACC 74-09.01. Tekstura izrezanih kriški kruha bez kore određena je na analizatoru teksture s aluminijskom sondom promjera 25 mm i mjernom ćelijom od 25 kg. Za mjerenje parametara čvrstoće sredine kruha parametri uređaja bili su: brzina pritiska  $100 \text{ mm min}^{-1}$  i 40 % kompresije. Uzorak kruha od dvije kriške skupa ( $2 \times 12,5 \text{ mm}$ ) postavljen je ispod sonde za kompresiju, a analiza je provedena prema zadanim parametrima u barem 6 ponavljanja. Grafički rezultati mjerenja obrađeni su pomoću računalnog programa Texture Exponent 32 koji je izračunao srednje vrijednosti čvrstoće i standardnu devijaciju mjerenja za svaki pojedini uzorak.

### 3.2.9. Obrada podataka

Podaci su obrađeni statistički u programu Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD), dok su izračun podataka za tablice i grafovi izrađeni u Microsoft Office Excel 365 ProPlus. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA), s Tukey post-hoc testom. Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrijednost  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana ultrazvuka visokog intenziteta na aktivnost enzima (polifenol oksidaze, peroksidaze i lipaze) i tehnološka svojstva pšeničnih posija. Pšenične posije nabavljene iz industrijskog mlina su dodatno usitnjene na ultra-centrifugalnom mlinu kako bi se dobila veličina čestica pogodna za primjenu u pekarske proizvode. Raspodjela veličine čestica određena je metodom laserske difrakcije te je određen udio topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana u posijama. Za daljnje analize korištene su usitnjene posije. Pripremljena je vodena suspenzija posija (15 i 30 %) i obrađena je ultrazvukom visokog intenziteta (400 W, 24 kHz, amplituda 80 %, 15 minuta, a ti uvjeti su prethodno definirani kao optimalni prema Habuš i sur., 2019). Nakon određivanja aktivnosti enzima (polifenol oksidaze, peroksidaze i lipaze), uslijedila je analiza tehnoloških svojstava tretiranih posija (dodano je 20 % posija iz 30 %-tne suspenzije) u smjesi s brašnom (kinetika agregacije glutena i želatinizacija škroba). Potom je pripremljeno krušno tijesto te su određena reološka svojstva i boja tijesta prije i za vrijeme odgođene fermentacije (0, 24 i 48 h) te je analizirana kvaliteta kruha s dodatkom tretiranih i netretiranih pšeničnih posija (boja, tvrdoća sredine, oblik te specifični volumen).

### 4.1. SVOJSTVA PŠENIČNIH POSIJA

U cilju određivanja svojstava pšeničnih posija, određena je raspodjela veličine čestica, udio vode i suhe tvari te udio vlakana (netopljivih, topljivih male i velike molekulske mase).

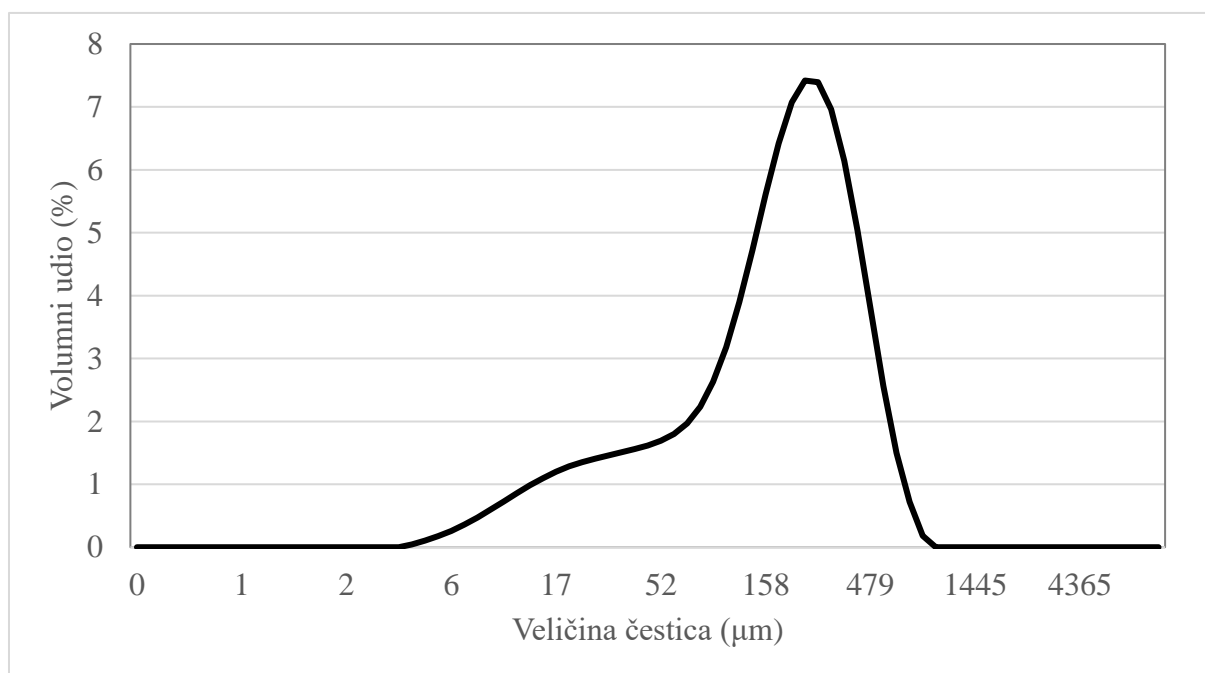
#### 4.1.1. Raspodjela veličine čestica

Raspodjela veličine čestica određena je metodom laserske difrakcije, a definirana je vrijednostima parametara raspodjele veličine čestica - D [3,2], d (0,1), d (0,5), d (0,9), te je promatran raspon ('span') raspodjele veličine čestica. Parametar D [3,2] je Sauterov promjer i on predstavlja površinski ekvivalentni promjer, koji u slučaju tretiranih posija ima manju vrijednost od nativnog uzorka. Raspon predstavlja širinu raspodjele čestica te uzorci s manjom vrijednosti raspona imaju užu distribuciju. U tablici 2 prikazani su rezultati raspodjele veličine

čestica nativnog uzorka iz industrijskog mlina ( $d(50) \sim 510 \mu\text{m}$ ) te onog samljevenog na ultra-centrifugalnom mlinu ( $d(50) \sim 180 \mu\text{m}$ ).

**Tablica 2.** Parametri raspodjele veličine čestica posija usitnjenih na ultra-centrifugalnom mlinu u odnosu na posije iz industrijskog mlina.

Mlin	D [3,2] ( $\mu\text{m}$ )	d (0,1) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,5) ( $\mu\text{m}$ )	d (0,9) ( $\mu\text{m}$ )	Raspon (span)
Industrijski ('510 $\mu\text{m}'$ )	297,23	218,26	508,03	1044,65	1,63
Ultra-centrifugalni ('180 $\mu\text{m}'$ )	62,99	24,04	177,47	401,58	2,13



**Slika 6.** Raspodjela čestica pšeničnih posija usitnjenih na ultra-centrifugalnom mlinu.

Iz dobivene krivulje na slici 6 vidljivo je kako su čestice veličine 100-500  $\mu\text{m}$  u najvećem volumnom udjelu u uzorku mljevenom na ultra-centrifugalnom mlinu što se smatra optimalnom veličinom čestica sirovina za pekarske proizvode (Noort i sur., 2010; Sanz-Penella, 2012).

#### 4.1.2. Udio vode i suhe tvari

Za izračun udjela mase suhe tvari u pšeničnim posijama i brašnu korišteni su eksperimentalno dobiveni podaci za količinu udjela vode u uzorcima. Svi rezultati prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Rezultati udjela vode i suhe tvari u uzorcima.

<b>Uzorak</b>	<b>Udio vode (%)</b>	<b>Udio suhe tvari (%)</b>
Posije iz industrijskog mlina ('510 $\mu\text{m}$ ')	12,86	87,14
Posije usitnjene na ultra-centrifugalnom mlinu ('180 $\mu\text{m}$ ') (nativne)	11,13	88,87
Posije usitnjene na ultra-centrifugalnom mlinu ('180 $\mu\text{m}$ ') (nakon UVI i liofilizacije)	3,21	96,79
Brašno	13,30	86,70

#### 4.1.3. Udio topljivih i netopljivih vlakana

Kako bi se dobila vrijednost udjela vlakana, određen je udio proteina te količina pepela u uzorku. Udio netopljivih te topljivih vlakana velike i male molekulske mase nesamljevenog uzorka i onog samljevenog na ultra-centrifugalnom mlinu ('180  $\mu\text{m}$ ') pšeničnih posija određen je metodom AOAC 2011.25. Prehrambena vlakna mogu se 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 4.** Sadržaj prehrambenih vlakana pšeničnih posija (% na suhu tvar) iz industrijskog mlina ('510  $\mu\text{m}$ ') i nakon usitnjavanja na ultra-centrifugalnom mlinu ('180  $\mu\text{m}$ ').

<i>Uzorak</i>	<b>Netopljiva</b>	<b>Topljiva</b>		<b>Ukupna</b>
		Velike molekulske mase	Male molekulske mase	
<i>510 <math>\mu\text{m}</math></i>	30,87 $\pm$ 1,69	4,52 $\pm$ 0,59	6,84 $\pm$ 0,06	42,24
<i>180 <math>\mu\text{m}</math></i>	24,67 $\pm$ 1,47	4,01 $\pm$ 0,20	6,36 $\pm$ 0,03	35,04

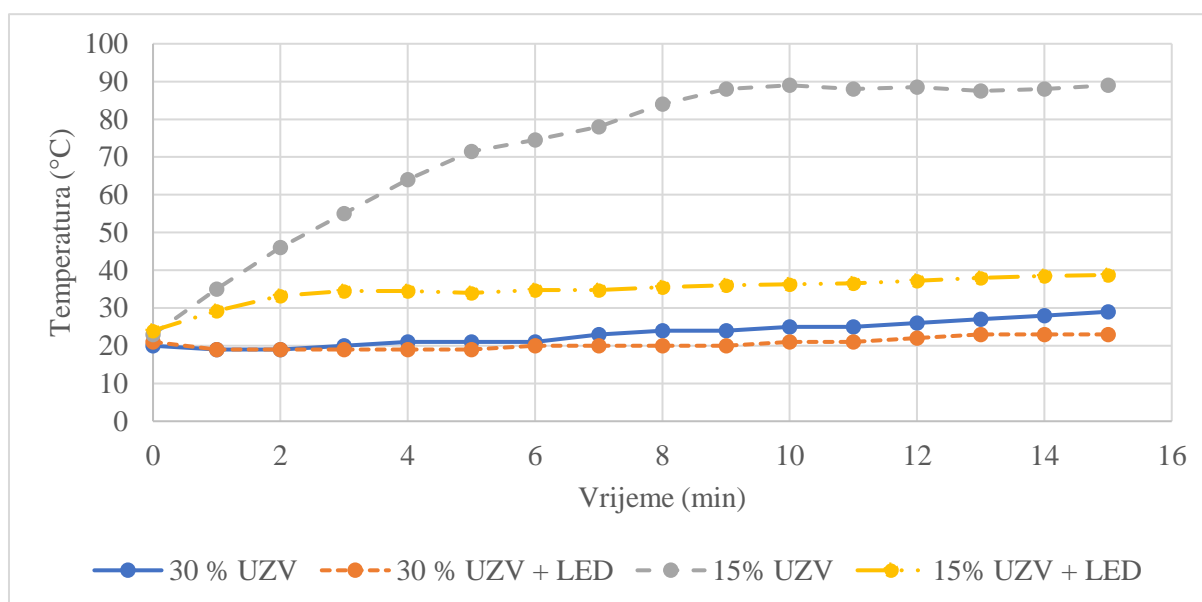
Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablici 4 može se vidjeti da udio netopljivih prehrambenih vlakana u nativnim pšeničnim posijama iznosi oko 30 % suhe tvari što je znatno veći udio u odnosu na ukupna topljiva vlakna (velike i male molekulske mase), čiji udio u pšeničnim posijama iznosi oko 9 % suhe tvari uzorka. Dobiveni rezultati ukupnih udjela vlakana (39,9 % i 35,0 %) u skladu su s istraživanjem Curti i sur. (2013) u kojem se udio prehrambenih vlakana u pšeničnim posijama kreće u rasponu od 33,4 do 63 % suhe tvari. Ukoliko u posijama ima više od 6 % topljivih vlakana, one se smatraju bogatima vlaknima (Pravilnik, 2010). U ovom slučaju, pšenične posije sadrže oko 10 % što znači da su pogodne za obogaćivanje drugih proizvoda vlaknima.

Nadalje, rezultati pokazuju kako se smanjenjem veličine čestica pšeničnih posija, smanjuje i udio netopljivih vlakana, dok raste udio topljivih male molekulske mase. Povećanje topljivosti u skladu je s prijašnjim istraživanjima te se kao razlog navodi smanjenje veličine te povećanje ukupne površine čestica, ali i pucanje staničnih stijenki čime rastu poroznost kapilarne sile (Chau i sur., 2007; Huang i sur., 2010; Hu i sur., 2015).

#### **4.2. PROMJENA TEMPERATURE TIJEKOM RAZLIČITIH NAČINA OBRADE**

Promjena temperature tijekom ultrazvučnog tretmana praćena je na uzorcima 15 %-tnih i 30 %-tnih vodenih suspenzija pšeničnih posija. Na slici 7 prikazane su promjene temperature uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta. Tijekom ultrazvučnog tretmana uređaj svake milisekunde bilježi trenutnu temperaturu uzorka te se na temelju tih podataka prati promjena temperature uzorka tijekom cijelog ultrazvučnog tretmana.

Rezultati prikazuju 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 kavitacijske mjehuriće (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 (Leighton, 1998). Kod 15 %-tne suspenzije najveće je zagrijavanje, čak do 89 °C, dok kod 30 %-tne suspenzije tretirane ultrazvukom sa i bez leda, porast temperature je zanemariv. Uzorak 15 %-tne suspenzije tretirane ultrazvukom u ledenoj kupelji također pokazuje zagrijavanje, ali samo desetak stupnjeva veće od one 30 %-tne suspenzije što ukazuje na to da tretman ultrazvukom nije bio potpuno efikasan.



**Slika 7.** Promjene temperature (°C) uzoraka pri različitim koncentracijama suspenzije posija tijekom tretiranja ultrazvukom bez i sa hlađenjem ledom.

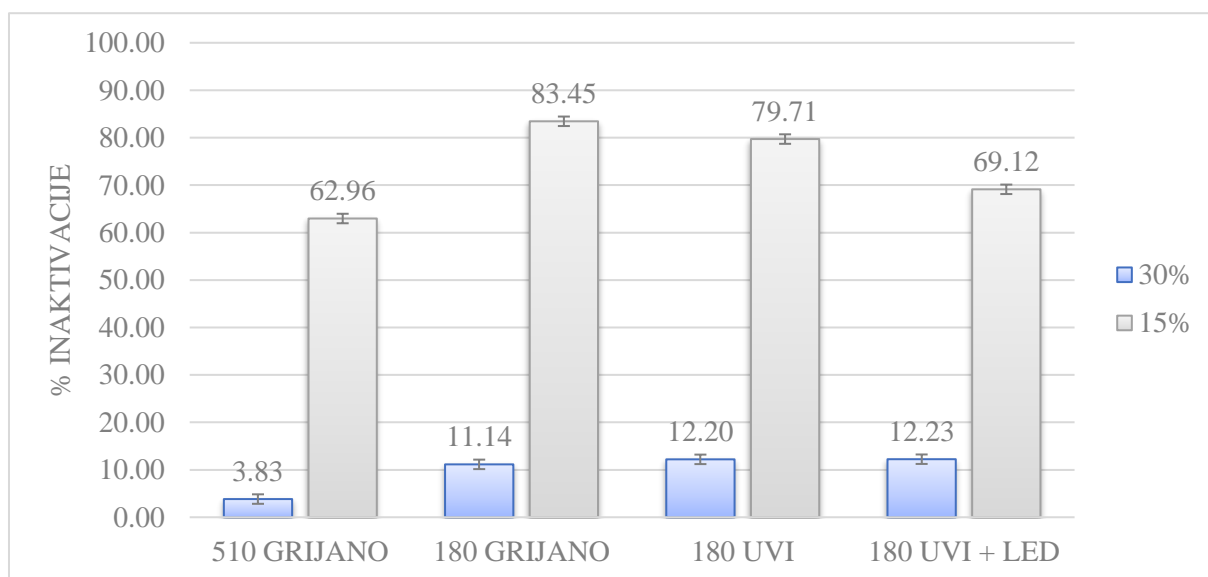
### 4.3. AKTIVNOST ENZIMA POSIJA

U uzorcima pšeničnih posija koji su tretirani UVI pri 15 %-tnim suspenzijama, određena je aktivnost polifenol oksidaze, peroksidaze, i lipaze. Ispitivanje je provedeno zbog činjenice da ultrazvuk visokog intenziteta može imati aktivacijski i inaktivacijski učinak na enzime (Mawson i sur., 2010; Lindasay i sur., 2016; Čukelj Mustač i sur., 2019). Antolić (2017) također navodi kako učinak ovisi o uvjetima tretmana ultrazvuka, ali i svojstvima proizvoda (pH, vodenoj aktivnosti i sl.), kao i o aminokiselinskom sastavu te konformaciji enzima (Özbek i

Ülgen, 2000; Muthukumarán i sur., 2006). Pretpostavlja se kako tretman ultrazvukom hidrolizira vezu između škroba i proteina čime oni postaju topljiviji i podložniji za inaktivaciju, a neki se rastvaraju i gube uređenu strukturu (Jin i sur, 2015; Zhang i sur., 2015).

#### 4.3.1. Polifenol oksidaza

Polifenol oksidaza je enzim koji sudjeluje u tamnjenju pšeničnih proizvoda zbog oksidacijskog djelovanja na endogene fenolne spojeve u prisutnosti kisika. Iako se polifenol oksidaza može uspješno inaktivirati zagrijavanjem na 70-90 °C kroz kratko vrijeme, problem je negativan utjecaj takvog tretmana na ostale tvari što rezultira manjim volumenom proizvoda, većim vremenom miješanja te manjom topljivosti ostalih proteina (Yadav i sur., 2010).



**Slika 8.** Inaktivacija polifenol oksidaze različitim načinima obrade posija u 15 i 30 %-tnoj suspenziji.

Na slici 8 vidljivo je da je najveća inaktivacija polifenol oksidaze ostvarena upravo u uzorku '180' GRIJANO 15 %-tne suspenzije, odnosno da zagrijavanje ima najveću sposobnost denaturacije enzima polifenol oksidaze. Kako je cilj ovoga istraživanja bio istražiti utjecaj ultrazvuka na pšenične posije, rezultati također pokazuju kako je moguća uspješna inaktivacija enzima tretiranjem ultrazvukom visokog intenziteta (skoro 80 % za uzorke '510' i '180 μm' za 15 %-tne suspenzije).

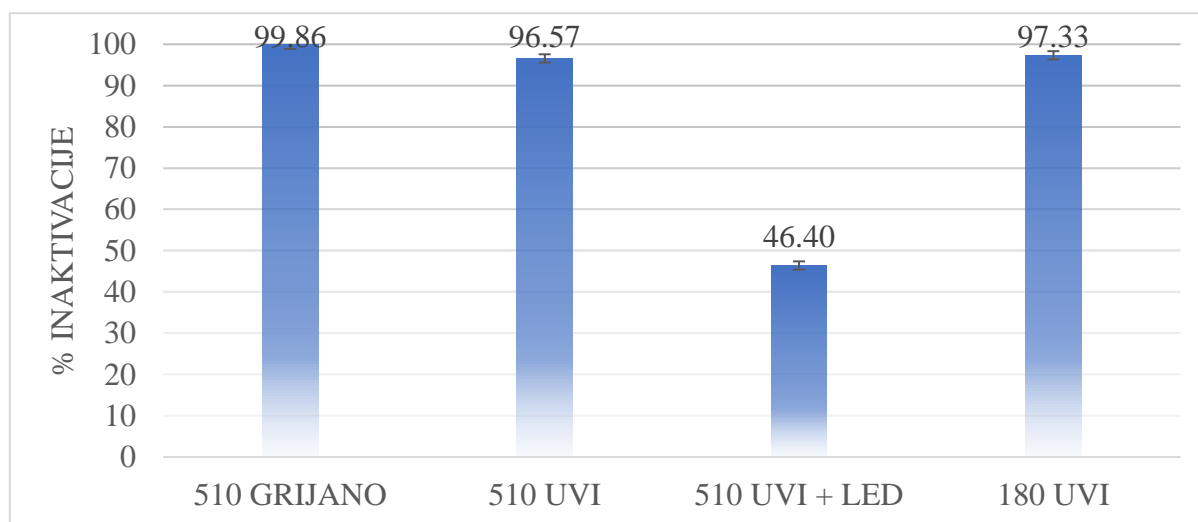


Istražen je i utjecaj različitih tretmana na inaktivaciju 30 %-tnih suspenzija, ali zbog vrlo niske inaktivacije, zaključeno je kako nema značajnog utjecaja tretmana pri toj koncentraciji pa su daljnje analize provedene na 15 %-tnim uzorcima.

Dobiveni rezultati također su u skladu i s rezultatima Niu i sur. (2014) koji su uspješno reducirali enzimsko tamnjenje rezanaca od integralnog brašna koje je uzrokovala polifenol oksidaza primjenom ultrazvučnog tretmana brašna uz uporabu antioksidansa (askorbinske kiseline i glutaciona). Kako je polifenol oksidaza koncentrirana u pšeničnim posijama, bolje je tretirati same posije nego cijelo integralno brašno. Time su potrebni i manji reaktori za tretiranje, a cijeli proces postaje efikasniji i jeftiniji. Liu i sur. (2016) također su dokazali kako tretman ultrazvukom visokog intenziteta uzrokuje smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze kod slatke dinje, a kao mehanizam inaktivacije smatra se kavitacija. Slične rezultate također su dobili Poudel i Rose (2018) te De Almeida i sur. (2014) koji su dokazali smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze nakon zagrijavanja pšeničnih posija vrućom parom u trajanju od 120 sekundi.

#### 4.3.2. Peroksidaza

Enzim peroksidaza je primjer oksidoreduktaze koji ima mogućnost pozitivnog učinka na glutensku mrežu, ali je to svojstvo zanemarivo u odnosu na negativan utjecaj na okus i boju uzrokovan nastankom peroksida (Every i sur., 2006; Antolić, 2017).



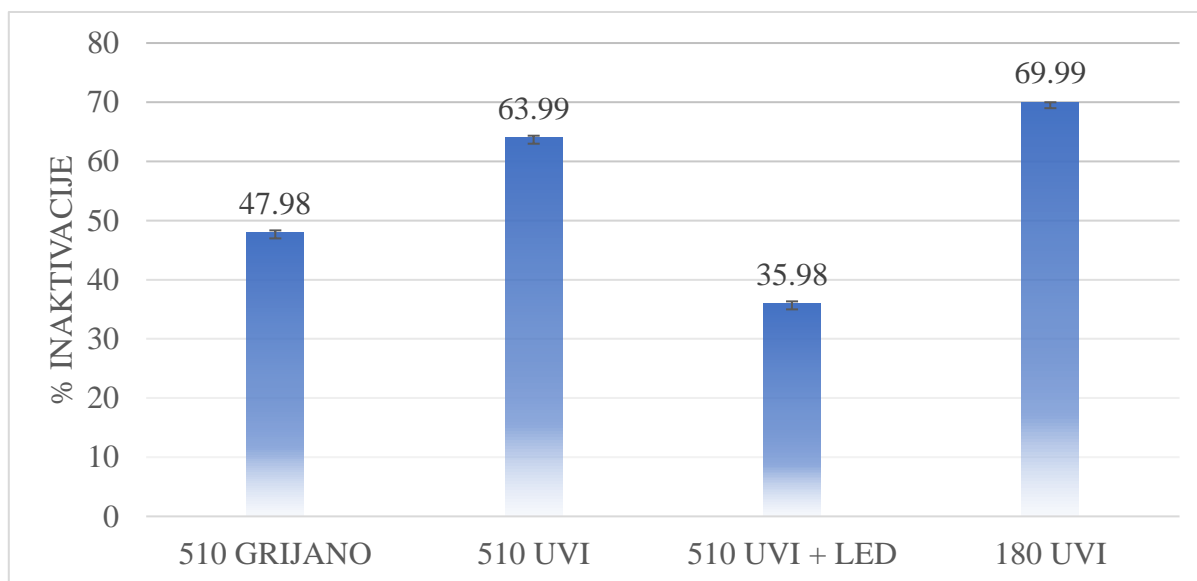
**Slika 9.** Inaktivacija peroksidaze različitom obradom 15 % suspenzije posija.

Analizom je dobiveno kako je najveću inaktivaciju enzima peroksidaze imao tretman zagrijavanja koji se provodio istom kinetikom rasta temperature kao i tretman ultrazvuka visokog intenziteta za 15 %-tnu suspenziju pšeničnih posija. Najmanja inaktivacija enzima zabilježena je kod uzorka koji se hladio ledom za vrijeme tretmana ultrazvukom (slika 9). Slične rezultate su dobili Poudel i Rose (2018) te De Almeida i sur. (2014) koji su dokazali smanjenje aktivnosti peroksidaze nakon zagrijavanja pšeničnih posija vrućom parom u trajanju od 120 sekundi.

Kako uzorci tretirani ultrazvukom imaju samo par posto manju inaktivaciju od onih zagrijavanih, može se zaključiti kako je ultrazvuk pogodan za tretiranje posija. Time bi se izbjegao utjecaj dugotrajnog tretiranja visokom temperaturom koja ima negativan utjecaj na ostale tvari poput vrijednih proteina, škroba i bioaktivnih tvari.

#### 4.3.3. Lipaza

Lipaza je vrsta hidrolitičkog enzima koja cijepa masne kiseline iz triacilglicerola. Umjerena količina lipolitičke aktivnosti je poželjna, ali negativni utjecaj lipolize očituje se promjenama finalnog proizvoda poput smanjenog volumena te lošije strukture sredina kruha (Tait i Galliard, 1988; Antolić, 2017). Prevelika aktivnost lipaze također utječe na smanjenje trajnosti tokom skladištenja proizvoda (integralnog brašna ili posija) (Piechowiak i sur., 2018).



**Slika 10.** Inaktivacija lipaze različitom obradom 15 % suspenzije posija.

Na slici 10 vidljivo je kako pšenične posije prosječne veličine čestica '180  $\mu\text{m}$ ' tretirane UVI imaju najveći postotak inaktivacije lipaze, dok je najmanja inaktivacija onih '510  $\mu\text{m}$ ' koje su bile hladene za vrijeme tretiranja UVI. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Poudel i Rose (2018) koji su dokazali kako se lipaza uspješno inaktivira tretiranjem vrućem parom tretmanom od 90 sekundi.

#### **4.4. TEHNOLOŠKA SVOJSTVA TRETIRANIH POSIJA U SMJESI BRAŠNA**

Kako bi se odredila tehnološka svojstva pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta u matrici brašna, korištene su dvije metode: GlutoPeak za agregaciju glutena te mikroviskoamilograf za želatinizirajuća svojstva škroba uzorka.

##### **4.4.1. Agregacija glutena**

Za analizu agregacije glutena, promatrani su: maksimalna torzija, maksimalno vrijeme te energija agregacije (Tablica 5). Prema Noort i sur. (2010), pšenične posije negativno utječu na stvaranje glutenske mreže, dok kalcijev klorid ima pozitivan utjecaj. Veličina čestica posija također se pokazala kao faktor koji utječe na agregaciju glutena što je u skladu s radom Niu i sur. (2014).

**Tablica 5.** Rezultati kinetike agregacije glutena uzoraka analiziranih na uređaju GlutoPeak (srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar iste kolone se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ )).

Uzorak			Vrijeme maksimalne torzije (s)	Maksimalna torzija (GPU)	Energija agregacije (cm <sup>2</sup> )
brašno (100 %)			91,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	69,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	1790,13 ± 16,30 <sup>a</sup>
<b>Smjesa brašna i posija (80 : 20)</b>					
Veličina čestica posija (µm)	Suspenzija posija u obradi (%)	Način obrade posija			
510	-	NATIVNE	56,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	68,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	1579,00 ± 17,68 <sup>b</sup>
510	15	UVI	33,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	78,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	1798,70 ± 18,17 <sup>a</sup>
180	-	NATIVNE	55,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	69,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	1584,03 ± 4,35 <sup>b</sup>
180	30	UVI	44,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	72,0 ± 2,8 <sup>ab</sup>	1600,90 ± 26,66 <sup>b</sup>
180	30	UVI + LED	46,0 ± 5,7 <sup>b</sup>	71,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	1597,03 ± 42,39 <sup>b</sup>
180	30	GRIJANO	49,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	71,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>	1561,08 ± 13,82 <sup>b</sup>
180	15	UVI	33,5 ± 0,7 <sup>c</sup>	76,5 ± 2,1 <sup>ab</sup>	1797,40 ± 9,83 <sup>a</sup>
180	15	UVI + LED	42,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	76,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>	1750,53 ± 54,91 <sup>a</sup>
180	15	GRIJANO	31,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	78,0 ± 5,7 <sup>a</sup>	1832,53 ± 0,18 <sup>a</sup>

Vidljivo je kako se općenito dodatkom 20 % posija u brašno smanjuje maksimalno vrijeme, a neznačajno se povećava maksimalna torzija u odnosu na čisto brašno. Ipak, najveću energiju agregacije je imao uzorak '180 µm' GRIJANO (15 %). Nadalje, najmanje maksimalno vrijeme potrebno za stvaranje glutenske mreže ima uzorak '180 µm' GRIJANO (15 %), no i ultrazvučna obrada posija je djelovala na skraćivanje vremena potrebnog za postizanje

maksimalne torzije. Stoga se može zaključiti kako dodatak pšeničnih posija tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta pozitivno djeluje na sposobnost stvaranja glutenske mreže, jer Wang i sur. (2018) navode kako su smanjenje maksimalnog vremena te povećanje maksimalne torzije znakovi boljeg stvaranja glutenske mreže. Manje maksimalno vrijeme u skladu je s Demir i Elgün (2013) koji ističu kako pšenične posije sadrže visoki udio glutatona koji je reducirajuća tvar i stvara disulfidne veze s glutenskom mrežom, a kako visoka temperatura inaktivira glutation i proteolitičke enzime, ali i lipooksigenazu koja jača glutensku mrežu, nije zabilježena i veća maksimalna torzija.

#### 4.4.2. Svojstva želatinizacije škroba

U cilju određivanja viskoznosti uzoraka, odnosno želatinizirajućih svojstava suspenzije vode i brašna (i posija), pratila su se tri parametra: maksimalna viskoznost, viskoznost na kraju perioda hlađenja te povratna viskoznost. Maksimalna viskoznost se povezuje sa stupnjem želatinizacije granula za vrijeme zagrijavanja, odnosno veća maksimalna viskoznost ukazuje na veći kapacitet vezanja vode na granule škroba. Povratna viskoznost povezuje se s retrogradacijom molekula škroba, odnosno mala vrijednost predstavlja malu moć retrogradacije škroba te sinerezu škrobne paste nakon hlađenja (Ragae i Abdel-Aal, 2006; Yildiz i sur., 2013).

Prema rezultatima u tablici 6 vidljivo je kako dodatak posija u brašno značajno smanjuje sve promatrane vrijednosti viskoznosti. Pretpostavlja se kako je razlog smanjenja maksimalne viskoznosti kompeticija vlakana i granula škroba za vodom, a kako posije općenito sadrže manje škroba od brašna, svi uzorci s posijama imaju manje vrijednosti od čistog brašna, što potvrđuju Tester i Morrison (1990). Kako vlakna imaju visoku retenciju vode, usporava se retrogradacija škroba pa je i povratna viskoznost niža (Elis i sur., 2016; Liu i sur., 2019), a to je vidljivo i u rezultatima ove analize.

Kada su u brašno dodani uzorci posija koje su bile zagrijavane konvencionalno ili ultrazvučno, došlo je porasta viskoznosti. Iz rezultata se može zaključiti kako grijane posije imaju najmanji negativan utjecaj na viskoznost, ali i one iz 15 %-tne suspenzije tretirane ultrazvukom, dok je najmanji porast viskoznost bio nakon ultrazvučne obrade posija u 30 %-tnoj suspenziji.

Zbog inaktivacije raznih enzima, moguće je da ultrazvuk inaktivira i amilaze ( $\alpha$  i  $\beta$ ) koje utječu na hidrolizu škroba pa time utječu i na svojstva želatinizacije. Kako posije sadrže visok udio amilaza koje su termolabilne, dodatkom nativnih posija se izrazito smanjila viskoznost smjese, ali značajno manje nakon dodatka ultrazvučno obrađenih posija u 15 %-tnoj suspenziji.

**Tablica 6.** Rezultati određivanja viskoznosti uzoraka na uređaju MVA (srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar iste kolone se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ )).

<i>Uzorak</i>			<i>Maksimalna viskoznost (BU)</i>	<i>Viskoznost na kraju perioda hlađenja (BU)</i>	<i>Povratna viskoznost (BU)</i>
<i>Brašno (100 %)</i>			849,0 ± 21,2 <sup>a</sup>	1356,5 ± 47,4 <sup>a</sup>	710,5 ± 20,5 <sup>a</sup>
<i>Smjesa brašna i posija (80 : 20)</i>					
<i>Veličina čestica posija (<math>\mu</math>m)</i>	<i>Suspenzija posija u obradi (%)</i>	<i>Način obrade posija</i>			
180	-	NATIVNE	365,0 ± 11,3 <sup>c</sup>	560,0 ± 5,7 <sup>cd</sup>	304,5 ± 0,7 <sup>c</sup>
180	30	UVI	356,5 ± 6,4 <sup>c</sup>	533,0 ± 1,4 <sup>d</sup>	288,0 ± 1,4 <sup>c</sup>
180	30	UVI + LED	408,5 ± 14,8 <sup>c</sup>	690,5 ± 30,4 <sup>c</sup>	365,0 ± 18,4 <sup>bc</sup>
180	30	GRIJANO	571,0 ± 7,1 <sup>b</sup>	940,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	471,0 ± 1,4 <sup>b</sup>
180	15	UVI	514,0 ± 5,7 <sup>b</sup>	845,5 ± 6,4 <sup>b</sup>	440,0 ± 1,4 <sup>b</sup>
180	15	UVI + LED	408,5 ± 14,8 <sup>c</sup>	690,5 ± 30,4 <sup>c</sup>	365,0 ± 18,4 <sup>bc</sup>
180	15	GRIJANO	571,0 ± 7,1 <sup>b</sup>	940,0 ± 2,8 <sup>b</sup>	471,0 ± 1,4 <sup>b</sup>

#### 4.5. REOLOŠKA SVOJSTVA KRUŠNOG TIJESTA S DODATKOM POSIJA

U tijesto je dodano 20 % pšeničnih posija ('180  $\mu$ m' iz 30 %-tne suspenzije) na masu pšeničnog brašna. Tvrdoća tijesta najveća je kod uzorka s tretiranim pšeničnim posijama prije odgođene fermentacije, dok je najmanja tvrdoća uzorka s nativnim posijama nakon 48 h odgođene fermentacije (tablica 7). To ukazuje na to da tretman ultrazvukom visokog intenziteta doprinosi tvrdoći tijesta, odnosno na povećanu moć upijanja vode, vjerojatno zbog bubrenja vlakana iz posija. Tvrdoća tijesta je povezana s jačanjem glutenske mreže, a kako tretman doprinosi povećanju agregacije glutena, skraćanju vremena miješanja i većoj sili torzije, ultrazvuk visokog intenziteta će utjecati i na reološka svojstva tijesta s tretiranim posijama. Elastičnost i kohezivnost tijesta se nisu razlikovale značajno između nativnih i tretiranih posija, dok je gumenost bila puno veća kod tretiranih uzoraka prije i poslije odgođene fermentacije, jer korelira s tvrdoćom. Yildiz i sur. (2013) su dokazali da se elastičnost smanjuje dodatkom neobrađenih posija. Kako je rezilijencija brzina kojom se tijesto vraća u prvobitni položaj nakon primjene sile (Smerdel i sur., 2012), vidljivo je da tretirani uzorci imaju veću brzinu povratka u prvotni oblik nego oni nativni što pokazuje da tretman UVI pozitivno utječe na glutensku mrežu tijesta i njezinu elastičnost.

**Tablica 7.** Rezultati određivanja reoloških svojstava tijesta s različitim pšeničnim posijama na TA.

Uzorak posija		Tvrdoća (g)	Elastičnost (mm)	Kohezivnost	Gumenost	Rezilijencija
Nativne	0 h	3516,7 $\pm$ 405,9	0,5 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,01	1297,3 $\pm$ 114,1	0,097 $\pm$ 0,003
	48 h	2749,7 $\pm$ 327,0	0,6 $\pm$ 0,07	0,45 $\pm$ 0,01	1231,6 $\pm$ 128,8	0,106 $\pm$ 0,004
UVI	0 h	5042,6 $\pm$ 380,4	0,5 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	1825,2 $\pm$ 82,1	0,105 $\pm$ 0,000
	48 h	4339,0 $\pm$ 195,1	0,6 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,00	1912,2 $\pm$ 99,7	0,120 $\pm$ 0,003

#### 4.6. BOJA KRUŠNOG TIJESTA S POSIJAMA TIJEKOM ODGOĐENE FERMENTACIJE

Boja je ključni parametar kvalitete pšeničnih proizvoda, a u ovom radu boja je određena difuzno reflektirajućom spektrofotometrijom na kolorimetru, pri čemu su dobivene vrijednosti svjetline, crvene i žute boje.

U tablici 8 prikazani su dobiveni rezultati izmjerenih parametara boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) te se može uočiti da je kod svih uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta manja svjetlina ( $L^*$ ) u odnosu na kontrolni uzorak. Parametar  $a^*$  koji predstavlja indikator crvenila je veći kod tretiranih uzoraka. Parametar  $b^*$  koji predstavlja indikator žutila pokazuje veće vrijednosti kod netretiranih uzoraka u odnosu na tretirane. Za proizvode s pšeničnim posijama poželjna je što veća svjetlina te što veći  $a^*$  i  $b^*$  parametri jer se crvena i žuta boja smatraju privlačnijima kada se radi o prehrambenim proizvodima.

**Tablica 8.** Parametri boje uzoraka tijesta s pšeničnim posijama netretiranih i tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta tijekom odgođene fermentacije (srednje vrijednosti označene različitim slovima unutar iste kolone se značajno razlikuju ( $p < 0,05$ )).

Uzorak posija		$L^*$	$a^*$	$b^*$
Nativne	0 h	68,05 ± 0,53 <sup>a</sup>	4,74 ± 0,62 <sup>b</sup>	17,68 ± 0,46 <sup>b</sup>
	24 h	66,79 ± 0,75 <sup>b</sup>	4,59 ± 0,58 <sup>b</sup>	17,05 ± 0,96 <sup>ab</sup>
	48 h	66,15 ± 0,77 <sup>b</sup>	4,39 ± 0,51 <sup>c</sup>	15,94 ± 0,82 <sup>c</sup>
UVI	0 h	63,61 ± 1,16 <sup>c</sup>	5,10 ± 0,62 <sup>a</sup>	17,84 ± 0,40 <sup>a</sup>
	24 h	65,85 ± 0,78 <sup>b</sup>	4,71 ± 0,57 <sup>b</sup>	16,56 ± 0,58 <sup>bc</sup>
	48 h	65,83 ± 0,41 <sup>b</sup>	4,62 ± 0,63 <sup>b</sup>	16,46 ± 0,66 <sup>bc</sup>

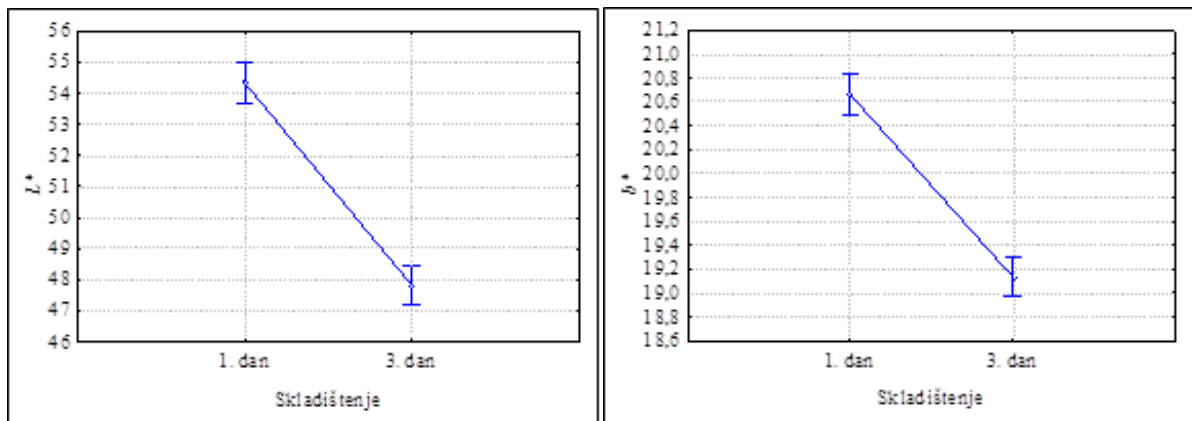
Već pri samom zamjesu bilo je vidljivo kako tijesto s tretiranim posijama ima tamniju boju od onog s nativnima. To ukazuje na nedovoljnu inaktivaciju polifenol oksidaze ultrazvučnim tretmanom posija u 30 % suspenziji. Međutim, tijekom odgođene fermentacije nativni uzorak je tamnio, dok je onom tretiranom rasla svjetlina te je ANOVA analizom utvrđeno kako tretman ultrazvukom visokog intenziteta značajno utječe na svjetlinu tijesta ( $p < 0,001$ ).



Iako se intenzitet crvenila tijesta smanjuje za tretirani i netretirani uzorak, uzorci se ne razlikuju značajno što potvrđuje i ANOVA analiza ( $p > 0,05$ ). Tretirani uzorci tijesta gube intenzitet žute boje tijekom odgođene fermentacije, odnosno parametar  $b^*$  se smanjuje, što potvrđuje i ANOVA analiza ( $p < 0,001$ ) neovisno o tome jesu li dodane native ili ultrazvučno obrađene posije.

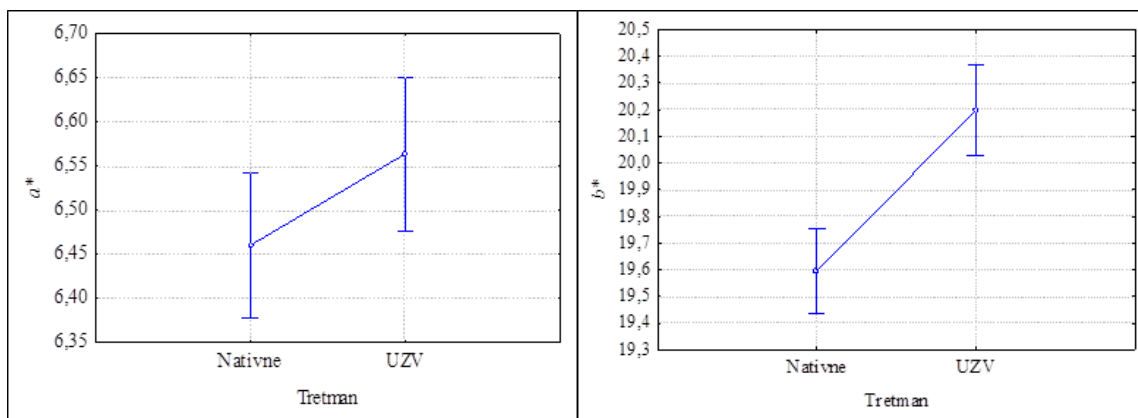
#### 4.7. SVOJSTVA KVALITETE KRUHA S POSIJAMA

Kvaliteta kruha može se odrediti kroz više svojstava, a neki od njih su tvrdoća, boja, specifični volumen te oblik. Za kruh je poželjno da mu tvrdoća sredine bude što manja, boja što svjetlija te specifični volumen i oblik što veći (Tomašković, 2009).



**Slika 11.** Ovisnost parametara boje  $L^*$  i  $b^*$  sredine kruha (s tretiranim i netretiranim posijama '180  $\mu\text{m}$ ' iz 30 %-tnih suspenzija) o vremenu odgođene fermentacije.

Na slici 11 vidljivo je kako se svjetlina sredine kruha značajno smanjila nakon 48 h odgođene fermentacije ( $p < 0,05$ ). Ovi rezultati ukazuju na to da se procesom odgođene fermentacije smanjuje svjetlina sredine kruha. Tretirani i netretirani uzorci međusobno su se malo razlikovali u svjetlini boje prije i poslije fermentacije, ali ne značajno. Također, nakon 48 h odgođene fermentacije, parametar  $b^*$  se značajno smanjio, što je i vidljivo na slici 11, a dokazano je ANOVA analizom ( $p < 0,05$ ). To je pokazatelj kako odgođena fermentacije utječe na smanjenje intenziteta žutila sredine kruha.



**Slika 12.** Ovisnosti parametra boje  $a^*$  i  $b^*$  za tretirani i netretirani uzorak sredine kruha s dodanim posijama '180  $\mu\text{m}$ ' iz 30 %-tne suspenzije.

ANOVA testom utvrđeno je kako se parametar  $a^*$  tretiranog i netretiranog uzorka sredine kruha ne razlikuje značajno ( $p = 0,087$ ), što je vidljivo i na slici 12. To govori kako na crvenilo sredine kruha značajno ne utječe tretman ultrazvukom visokog intenziteta. Međutim, vidljivo je kako se parametar  $b^*$ , odnosno indikator žutila sredine kruha s posijama koje su tretirane ultrazvukom visokog intenziteta, značajno razlikuje od onih netretiranih što potvrđuje ANOVA test ( $p < 0,05$ ). Time je dokazano kako tretman značajno utječe na povećanje žutila sredine kruha s ultrazvučno tretiranim posijama u odnosu na one netretirane.

Za određivanje svojstava kvalitete kruha s posijama iz odgođene fermentacije također su određeni i specifični volumen te oblik što je prikazano u tablici 9. Također je utvrđeno da se uzorci s dodatkom tretiranih ili netretiranih posija ni prije ni poslije odgođene fermentacije ne razlikuju značajno u čvrstoći sredine kruha ( $p > 0,1$ ), ali se razlikuju tako što su uzorci imali veću čvrstoću prije u odnosu na one nakon odgođene fermentacije što potvrđuju i prethodna istraživanja iz literature (Wang i sur., 2002; Hung i sur., 2007; Kim i sur., 2013). Promjene reoloških svojstava tijesta tijekom fermentacije poništile su povećanje tvrdoće tijesta koje je zabilježeno kod dodatka ultrazvučno obrađenih posija. Može se zaključiti kako tretman posija ultrazvukom visokog intenziteta nema negativan utjecaj na svojstva kvalitete kruha s dodanim posijama. Pri tome je potrebno napomenuti kako su za zamjes korištene posije ultrazvučno obrađene u 30 %-tnoj suspenziji, pa bi u idućim istraživanjima bilo potrebno ispitati utjecaj dodatka posija obrađenih u 15 % suspenziji.

Promjene koje uzrokuje tretman ultrazvukom visokog intenziteta na tijesto i kruh mogu se povezati time što kod oba slučaja za sve uzorke svjetlina i intenzitet žutila padaju nakon

odgođene fermentacije (osim kod tretiranog tijesta kojemu svjetlina raste), dok se intenzitet crvenila ne mijenja značajno.

**Tablica 9.** Rezultati određivanja specifičnog volumena i oblika kruha s pšeničnim posijama iz odgođene fermentacije.

<i>Uzorak brašno + posije</i>		<b>Specifični volumen (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Oblik</b>	<b>Čvrstoća sredine (g)</b>
<i>Nativne</i>	0 h	2,46 ± 0,30	0,44 ± 0,02	778,08 ± 58,40
	48 h	2,38 ± 0,16	0,37 ± 0,02	597,86 ± 48,87
<i>UVI</i>	0 h	2,47 ± 0,09	0,47 ± 0,02	817,26 ± 72,18
	48 h	2,40 ± 0,12	0,51 ± 0,03	618,92 ± 73,41

Suprotno rezultatima ovog istraživanja, Sanz-Penella i sur. (2012) navode kako se odgođenom fermentacijom 24 h čvrstoća sredine kruha znatno povećala, ali dodatkom  $\alpha$ -amilaze su ju smanjili čime su dokazali kako dodatak  $\alpha$ -amilaze pozitivno utječe na čvrstoću sredine kruha s dodanim posijama iz odgođene fermentacije. Također ističu kako dodatak posija značajno smanjuje volumen kruha te da veći utjecaj na čvrstoću sredine kruha imaju manje čestice pšeničnih posija najvjerojatnije zbog toga što lakše ometaju stvaranje glutenske mreže.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Ultrazvuk visokog intenziteta dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti polifenol oksidaze, peroksidaze te lipaze u pšeničnim posijama. Smanjenje aktivnosti ovisi o udjelu posija u suspenziji, a pripisuje se nastalim konformacijskim promjenama uzrokovanih zagrijavanjem i kavitacijom tijekom tretmana ultrazvukom pri čemu dolazi do inaktivacije termolabilnih enzima.
2. Tretman posija ultrazvukom značajno utječe na poboljšanje tehnoloških svojstava smjese brašna i posija, odnosno na kinetiku agregacije glutena i svojstva želatinizacije brašna u koje su dodane pšenične posije.
3. Krušno tijesto u koje su dodane ultrazvučno obrađene posije ima veću tvrdoću, gumenost i rezilijenciju tijesta, tamniju i crveniju boju, ali nepromijenjenu elastičnost i kohezivnost u odnosu na tijesto u koje su dodane nativne posije. Odgođena fermentacija tijesta kroz 48h smanjuje negativne promjene na tijestu uzrokovane ultrazvučnom obradom posija.
4. Glavna svojstva kvalitete (specifični volumen, oblik, čvrstoća sredine, svjetlina i intenzitet crvene boje) kruha s dodatkom posija u količini od 20% (na masu brašna) ne ovise o ultrazvučnoj obradi posija, osim intenziteta žute boje  $b^*$  sredine kruha koji se povećao.
5. Ultrazvuk visokog intenziteta predstavlja obećavajuću tehnologiju obrade pšeničnih posija zbog inaktivacijskog utjecaja na enzime čime se povećava njihova stabilnost i trajnost, a pritom ima i pozitivan ili neutralan utjecaj na tehnološka svojstva pšeničnih posija.

## 6. LITERATURA

AACC International Method 10-05.01 Measurement of Volume by Rapeseed Displacement.

AACC International Method 22-85.01 Measurement of Polyphenol Oxidase in Wheat Kernels (L-DOPA Substrate).

AACC International Method 32-05.01 Total Dietary Fiber.

AACC International Method 32-21. 01 Insoluble and Soluble Dietary Fiber in Oat Products - Enzymatic-Gravimetric Method.

AACC International Method 74-09.01 Measurement of Bread Firmness by Universal Testing Machine.

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

Adom, K.K., Sorrells, M., Liu, R. (2005) Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2297-306.

Albers, S., Muchová, Z., Fikselová, M. (2009) The effects of different treated brans additions on bread quality. *SAB* **40**, 67-72.

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

Anderson, J. V., Morris, C. F. (2001) An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Sci.* **41**, 1697-1705.

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

Antolić, A. (2017) Tehnološke mogućnosti bolje iskoristivosti pšeničnih posija, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Antov, M. G., Đorđević, T. R. (2017) Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. *Food Chem.* **235**, 175-180.

AOAC Official Method 2011.25 Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods.

Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S., Kneifel, W. (2013) Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. *LWT-Food Sci. Technol.* **56**, 222-231.

Armero, E., Collar, C. (1997) Texture properties of formulated wheat doughs, Relationships with dough and bread technological quality. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **204**, 136-145.

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

Benković, M. (2013) Fizikalno-kemijska i senzorska svojstva obogaćenih praškastih mješavina na bazi kave, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.

Benković, M., Srećec, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Bauman, I. (2013) Flow properties of commonly used food powders and their mixtures. *Food Bioprocess. Tech.* **6**, 2525-2537.

Bhandari, B. R., D'Arcy, B. R., Padukka, I. (1999) Encapsulation of lemon oil by paste method using beta-cyclodextrin: Encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 5194-5197.

Chau, C. F., Wang, Y. T., Wen, Y. L., (2007) Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chem.* **100**, 1402-1408.

CIE (2004) Technical Report: Colorimetry, 3. izd. CIE - International Commission on Illumination, Vienna, Austria.

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 Mustač, N., Voučko, B., Novotni, D., Drakula, S., Gudelj, A., Dujmić, F., Čurić, D. (2019) Optimization of High Intensity Ultrasound Treatment of Proso Millet Bran to Improve Physical and Nutritional Quality. *Food Technol. Biotech.* **57**, 183-190.

Čurić, D., Novotni, D., Voučko, B., Čukelj Mustač, N. (2020) Mogućnosti upotrebe nusproizvoda mlinske industrije za proizvodnju funkcionalne hrane. U: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije knjiga 2, (Šubarić, D., Babić, J., ured.), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnoški fakultet Osijek,

Osijek, str. 37-62.

De Almeida, J. L., Pareyt, B., Gerits, L. R., Delcour, J. A. (2014) Effect of wheat grain steaming and washing on lipase activity in whole grain flour. *Cereal Chem.* **91**, 321-326.

De Brier, N., Gomand, S. V., Joye, I. J., Pareyt, B., Courtin, C. M., Delcour, J. A. (2014) The impact of pearling as a treatment prior to wheat roller milling on the texture and structure of bran-rich breakfast flakes. *LWT-Food Sci. Technol.* **62**, 668-674.

De Brier, N., Hemdane, S., Dornez, E., Gomand, S. V., Delcou, J. A., Courtin, C. M. (2015) Structure, chemical composition and enzymatic activities of pearlings and bran obtained from pearled wheat (*Triticum aestivum L.*) by roller milling. *J. Cereal Sci.* **62**, 66-72.

Demir, M. K., Elgün, A. (2013) Stabilization of whole wheat flour branny fractions with special emphasis on internal and external characteristic of whole wheat bread. *Food Sci. and Technol. Res.* **19**, 195-200.

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 breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2246-2253.

Durante M., Lenucci, M. S., Laddomada, B., Mita, G., Caretto, S. (2012b) Effects of sodium alginate bead encapsulation on the storage stability of durum wheat (*Triticum durum Desf.*) bran oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10689-10695.

Durante, M., Lenucci, M. S., Rescio, L., Mita, G., Caretto, S. (2012a) Durum wheat by-products as natural sources of valuable Nutrients. *Phytochem. Rev.* **11**, 255-262.

Eisenmenger, M., Dunford, N. T. (2008) Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 55-61.

Elis, R. F. B., Tatiana, O., Joseane, B., Gabriela, S. S., Telma, E. B., Luiz, C. G. (2016) Rheological properties of wheat flour dough and pan bread with wheat bran. *J. Cereal Sci.* **71**, 177-182.

European Union (2011) Commission implementing decision of 11 April 2011 concerning the non-inclusion of dichlobenil in Annex I to Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union* **54**, 14-15.

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**, 62-8.

Falsafi, S. R., Maghsoudlou, Y., Rostamabadi, H., Rostamabadi, M. M., Hamed, H., Hosseini, S. M. H. (2019) Preparation of physically modified oat starch with different sonication treatments. *Food Hydrocoll.* **89**, 311-320.

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

Gökmen, V., Sügüt, I. (2007) A Non-Contact Computer Vision Based Analysis of Color in Foods. *Int. J. Food Eng.* doi: 10.2202/1556-3758.1129

Guo, J., Bian, Y.-Y., Zhu, K.-X., Guo, X.-N., Peng, W., Zhou, H.-M. (2015) Reducing phytate content in wheat bran by directly removing the aleurone cell content with teeth roller mill and ultrasonic cleaner. *J. Cereal Sci.* **64**, 133-138.

Habuš, M., Antolić, A., Šišić, G., Voučko, B., Čukelj Mustač, N., Novotni, D., Čurić, D. (2019) High-intensity ultrasound treatment for the inactivation of polyphenol oxidase from wheat bran. U: Jozinović, A., Budžaki, S., Strelec, I., Lončarić, A. (ur.) Book of Abstracts of 10th International Congress „Flour-Bread '19“ and the 12th Croatian Congress of Cereal Technologists “Brašno-Kruh '19. Osijek: Grafika, str. 44-44.

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. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 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.

Hidalgo, A., Brusco, M., Plizzari, L., Brandolini, A. (2013) Polyphenol oxidase, alpha-amylase and beta-amylase activities of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: A two-year study. *J. Cereal Sci.* **58**, 51-58.

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



- Hu, R., Zhang, M., Adhikari, B., Liu, Y. (2015) Effect of homogenization and ultrasonication on the physical properties of insoluble wheat bran fibres. *Int. Agrophys.* **29**, 423-432.
- Huang, C. C., Chen, Y. F., Wang, C. C. (2010) Effects of micronization on the physico-chemical properties of peels of three root and tuber crops. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 759-763.
- Hung, P. V., Maeda, T., Morita, N. (2007) Dough and bread qualities of flour with whole waxy wheat flour substitution. *Food Res. Int.* **40**, 273-279.
- ICC – Standard No. 162 (1996) Rapid Pasting Method using the Newport Rapid Visco Analyser.
- Jacobs, P. J., Hemdane, S., Claes, S., Mulders, L., Langenaeken, N. A., Dewettinck, K., Courtin, C. M. (2018) Wheat bran-associated subaleurone and endosperm proteins and their impact on bran-rich bread-making. *J. Cereal Sci.* **81**, 99-107.
- Jin, J., Ma, H., Wang, K. (2015) Effects of multi-frequency power ultra-sound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrason. Sonochem.* **24**, 55.
- Kim, B. K., Cho, A. R., Chun, Y. G., Park, D. J. (2013) Effect of microparticulated wheat bran on the physical properties of bread. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **64**, 122-129.
- Kock, S. D., Taylor, J., Taylor, J. R. N. (1999) Effect of heat treatment and particle size of different brans on loaf volume of brown bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **32**, 349-356.
- Krhan, M. (2019) Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na polifenolni i aromatski sastav vina Cabernet Sauvignon tijekom starenja, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- 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.
- Kwon, K. T., Uddin, M. S., Jung, G. W., Sim, J. E., Chun, B. S. (2010) Supercritical carbon dioxide extraction of phenolics and tocopherols enriched oil from wheat bran. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* **64**, 255-260.
- Laddomada, B., Caretto, S., Mita, G. (2015) Wheat bran phenolic acids: Bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules* **20**, 15666-15685.

Lebesi, D. M., Tzia, C. (2011) Effect of the addition of different dietary fiber and edible cereal bran sources on the baking and sensory characteristics of cupcakes. *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 710-722.

Lei, L., Wei, W., Zhang, R., Wei, Z., Deng, Y., Xiao, J., Zhang, M. (2017) Complex enzyme hydrolysis releases antioxidative phenolics from rice bran. *Food Chem.* **214**, 1-8.

Leighton, T. G. (1998) The principles of cavitation. U: *Ultrasound in Food Processing*, (Povey, M. J. W., Mason, T. J., ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 151-182.

Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* **56**, 311-330.

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.

Liu, N., Ma, S., Li, L. Wang, X. (2019) Study on the effect of wheat bran dietary fiber on the rheological properties of dough. *Grain Oil Sci. Technol.* **2**, 1-5.

Malvern Instruments Ltd. (2007) Mastersizer 2000: Mastersizer 2000 User Manual. <[https://www.labmakelaar.com/fjc\\_documents/mastersizer-2000-2000e-manual-eng1.pdf](https://www.labmakelaar.com/fjc_documents/mastersizer-2000-2000e-manual-eng1.pdf)>.

Pristupljeno 14. siječnja 2020.

Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing – the way forward. U: *Ultrasound in Food Processing*, (Povey, M. J. W., Mason, T. J., ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 153.

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-Canovas, G., Weiss, J., ured.), Springer, New York, str. 369-404.

Megazyme International Ireland (2017) Total dietary fiber. Asasay procedure. <[https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-TDFR-200A\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-TDFR-200A_DATA.pdf)>. Pristupljeno 9. veljače, 2020.

Miano, A. C., Ibarz, A., Augusto, P. E. D. (2017) Ultrasound technology enhances the hydration of corn kernels without affecting their starch properties. *J. Food Eng.* **197**, 34-43.

Mutak, N. (2018) Primjena rogačevog kiselog tijesta u proizvodnji pekarskih proizvoda, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

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.

Nandeesh, K., Jyotsna, R., Rao, G. V. (2011) Effect of differently treated wheat bran on rheology, microstructure and quality characteristics of soft dough biscuits. *J. Food Process. Pres.* **35**, 179-200.

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

Noort, M. W. J., van Haaster, D., Hemery, Y., Schols, H. A., Hamer, R. J. (2010) The effect of particle size of wheat bran fractions on bread quality—Evidence for fibre–protein interactions. *J. Cereal Sci.* **52**, 59-64.

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.

Olaerts, H., De Bondt, Y., Courtin, C. M. (2017) The heterogeneous distribution of  $\alpha$ -amylase and endoxylanase activity over a population of preharvest sprouted wheat kernels and their localization in individual kernels *J. Cereal Sci.* **74**, 200-209.

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. Technol.* **50**, 2509–2518.

O'Sullivan, J., Park, M., Beevers, J. (2016) The effect of ultrasound upon the physicochemical and emulsifying properties of wheat and soy protein isolates. *J. Cereal Sci.* **69**, 77-84.

Özbek, B., Ülgen, K. Ö. (2000) The stability of enzymes after sonication. *Process Biochem.* **35**, 1037-1043.

Pasqualone, A., Delvecchio, L. fN., Gambacorta, G., Laddomada, B., Urso, V., Mazzaglia, A., Ruisi, P., di Miceli, G. (2015) Effect of supplementation with wheat bran aqueous extracts obtained by ultrasound-assisted technologies on the sensory properties and the antioxidant activity of dry pasta. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 1739-1742.

Peressini, D., Sensidoni, A. (2009) Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. *J. Cereal Sci.* **49**, 190-201.

Piechowiak, T., Józefczyk, R., Balawejder, M. (2018) Impact of ozonation process of wheat flour on the activity of selected enzymes. *J. Cereal Sci.* **84**, 30-37.

Poudel, R., Rose, D. J. (2018) Changes in enzymatic activities and functionality of whole wheat flour due to steaming of wheat kernels. *Food Chem.* **263**, 315-320.

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

Pravilnik o prehranbenim i zdravstvenim tvrdnjama (2010) *Narodne novine* **84**, Zagreb.

Qin, X. S., Sun, Q. Q., Zhao, Y. Y., Zhong, X. Y., Mu, D. D., Jiang, S. T., Luo, S. Z., Zheng, Z. (2017) Transglutaminase-set colloidal properties of wheat gluten with ultrasound pretreatments. *Ultrason. Sonochem.* **39**, 137-143.

Ragae, S., Abdel-Aal, E. M. (2006) Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chem.* **95**, 9-18.

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.

Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R., Angelis, M. D., Gobbetti, M. (2010) Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chem.* **119**, 1079-1089.

Sanz-Penella, J. M., Laparra, J. M., Sanz, Y., Haros, M. (2012) Influence of Added Enzymes and Bran Particle Size on Bread Quality and Iron Availability. *Cereal Chem.* **89**, 223-229.

Shewry, P. R., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Jenkins, J. A., Mills, E. N. C., Békés, F. (2009) Wheat Grain Proteins. U: *Wheat: Chemistry and Technology*, 4. izd. (Khan, K., Shewry P. R.,

ured.), AACC International, St. Paul, M. N., str. 223-298.

Smerdel, B., Pollak, L., Novotni D., Čukelj, N., Benković, M., Lušić, D., Ćurić, D. (2012) Improvement of gluten-free bread quality using transglutaminase, various extruded flours and protein isolates. *J. Food Nutr. Res.* **51**, 242-253.

Sopade, P. A., Hordin, M., Fitzpatrick, P., Desmee, H., Halley, P. (2006) Macromolecular interactions during gelatinization and retrogradation in starchwhey systems as studied by Rapid Visco-Analyser. *Int. J. Food Eng.* **2**, 1-17.

Srivastava, A. K., Sudha, M. L., Baskaran, V., Leelavathi, K. (2007) Studies on heat stabilized wheat germ and its influence on rheological characteristics of dough. *Eur. Food Res. Technol.* **224**, 365-372.

Stable Micro Systems Ltd (2009) TA.HDplus Texture Analyser. <<http://stablemicrosystems.com.cn/tahdplus.htm>> Pristupljeno 6. veljače 2020.

Stevenson, L., Phillips, F., O'Sullivan, K., Walton, J. (2012) Wheat bran: Its composition and benefits to health, a European perspective. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 1001-1013.

Sun, R. C., Sun, X. F., Ma, X. H. (2002) Effect of ultrasound on the structural and physiochemical properties of organosolv soluble hemicelluloses from wheat straw. *Ultrason. Sonochem.* **9**, 95-101.

Škrbić, B., Filipčev, B. (2008) Nutritional and sensory evaluation of wheat breads supplemented with oleic-rich sunflower seed. *Food Chem.* **108**, 119-129.

Tait, S. P. C., Galliard, T. (1988) Effect on baking quality of changes in lipid composition during wholemeal storage. *J. Cereal Sci.* **8**, 125-137.

Tester, R. F., Morrison, W. R. (1990) Swelling and amylosization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chem.* **67**, 551-557.

Tolouie, H., Mohammadifar, M. A., Ghomi, H., Yaghoubi, A. S., Hashemi, M. (2018) The impact of atmospheric cold plasma treatment on inactivation of lipase and lipoxygenase of wheat germs. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **47**, 346-352.

Tomašković, L. (2009) Tekstura polupečenih smrznutih kruhova dobivenih uz dodatak kiselog

tijesta, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Wang, J., Hou, G. G., Liu, T., Wang, N., Bock, J. (2018) GlutoPeak method improvement for gluten aggregation measurement of whole wheat flour. *LWT-Food Sci. Technol.* **90**, 8-14.

Wang, J., Rosell, C. M., de Barber, C. B. (2002) Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chem.* **79**, 221-226.

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

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300-312.

Yadav, D. N., Patki, P. E., Srihari, S. P., Sharma, G. K., Bawa, A. S. (2010) Studies on polyphenol oxidase activity of heat stabilized whole wheat flour and its chapatti making quality. *Int. J. Food Prop.* **13**, 142-154.

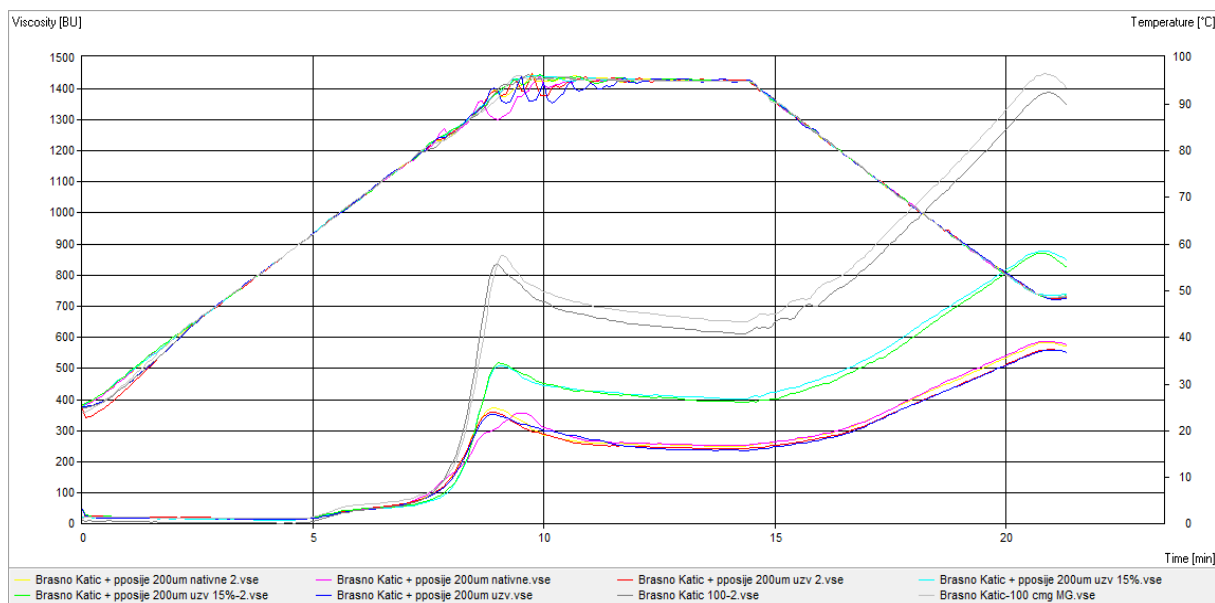
Yildiz, Ö., Yurt, B., Baştürk, A., Toker, Ö. S., Yilmaz, M. T., Karaman, S., Dağlioğlu, O. (2013) Pasting properties, texture profile and stress-relaxation behavior of wheat starch/dietary fiber systems. *Food Res. Int.* **1**, 278-290.

Zhang, H., Wang, H., Cao, X., Wang, J. (2018) Preparation and modification of high dietary fiber flour: A review. *Food Res. Int.* **113**, 24-35.

Zhang, Y., Ma, H., Wang, B., Qu, W., Li, Y., He, R., Wali, A. (2015) Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymolysis and Structural Characterization of Wheat Gluten. *Food Biophys.* **10**, 385-395.

Zhu, F. (2015) Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. *Trends Food Sci. Technol.* **43**, 1-17.

## 7. PRILOZI



**Prilog 1.** Viskoznost uzoraka određena na mikroviskoamilografu.

## 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.

Marja Gregor

Ime i prezime studenta