

Utjecaj kriomljevenja i enzimskog tretmana na udjel vlakana u tretiranim uzorcima ljusaka heljde

Prodanović, Ana- 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:159:331790>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 15. srpanj 2020.

Ana-Marija Prodanović

1137/USH

**UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I
ENZIMSKOG TRETMANA NA
UDJEL VLAKANA U
TRETIRANIM UZORCIMA
LJUSAKA HELJDE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marine Krpan Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Saše Drakule, mag. ing.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Krpan na prenesenom znanju tijekom studija, stručnim savjetima te stručnom vodstvu.

Zahvaljujem se asistentici Saši Drakuli, mag. ing., na strpljivosti, susretljivosti i pomoći, kao i uloženom trudu vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima na pruženoj prilici za obrazovanje i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ KRIOMLJEVENJA I ENZIMSKOG TRETMANA NA UDJEL VLAKANA U TRETIRANIM UZORCIMA LJUSAKA HELJDE

Ana-Marija Prodanović, 1137/USH

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj kriomljevenja i enzimskog tretmana celulazom i hemicelulazom na udjel netopljivih vlakana, vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 %-tnom etanolu i vlakana topljivih u vodi i u 78 %-tnom etanolu u uzorcima ljusaka heljde te utjecaj kriomljevenja na kapacitet zadržavanja vode. Kriomljevenje je provedeno u trajanju od 8 minuta ili u ciklusima po 8 minuta do postizanja veličine čestica $< 56 \mu\text{m}$. Enzimski tretman proveden je u trajanju od 1, 4 i 8 sati, uz dodatak 0,1 % ili 1 % enzima. Rezultati su pokazali da interakcija veličine čestica ljusaka heljde, vremena enzimskog tretmana i udjela dodanih enzima značajno utječe na udjel topljivih i netopljivih vlakana. Optimalnim se pokazalo usitnjavanje uzorka na veličinu čestica $< 56 \mu\text{m}$ te enzimski tretman tijekom jednog sata uz dodatak 1 % enzima, pri čemu je celulaza značajnije utjecala na povećanje udjela topljivih vlakana. Kriomljevenje i enzimski tretman nisu imali statistički značajan utjecaj na kapacitet zadržavanja vode tretiranog uzorka.

Ključne riječi: ljuske heljde, kriomljevenje, vlakna, enzimski tretman, kapacitet zadržavanja vode

Rad sadrži: 49 stranica, 13 slika, 3 tablice, 33 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Mirjana Hruškar (predsjednica)
2. izv. prof. dr. sc. Marina Krpan
3. doc. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustač
4. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjena)

Datum obrane: 15. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF CRYOMILLING AND ENZYMATIC TREATMENT ON THE CONTENT OF DIETARY FIBER IN TREATED SAMPLES OF BUCKWHEAT HULLS

Ana-Marija Prodanović, 1137/USH

Abstract: This study examined the effect of cryomilling and enzymatic treatment with cellulase and hemicellulase on insoluble dietary fibre, dietary fibre soluble in water but not in 78 % ethanol, and dietary fibre soluble in water and 78 % ethanol in buckwheat hulls samples and effect of cryomilling on water retention capacity. Cryomilling was carried out for 8 minutes, or in 8-minute cycles, until the particle size of $< 56 \mu\text{m}$ was reached. Enzymatic treatment was performed in periods of 1, 4 and 8 hours, with addition of 0,1 % or 1 % of enzymes to the samples. The results have shown that interaction of particle size of buckwheat hull samples, the duration of enzymatic treatment and the content of added enzymes significantly affects the content of soluble and insoluble dietary fibre. Milling the samples to the particle size of $< 56 \mu\text{m}$ combined with enzymatic treatment lasting 1 hour and addition of 1 % enzymes proved to be optimal, since cellulase significantly affected the increase of the content of soluble dietary fibre. Cryomilling and enzymatic treatment had no statistically significant effect on water retention capacity of the treated sample.

Keywords: buckwheat hulls, cryomilling, dietary fiber, enzymatic treatment, water retention capacity

Thesis contains: 49 pages, 13 figures, 3 tables, 33 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Marina Krpan, Associate professor

Technical support and assistance: Saša Drakula, MSc

Reviewers:

1. PhD Mirjana Hruškar, Full professor
2. PhD Marina Krpan, Associate professor
3. PhD Nikolina Čukelj Mustač, Associate professor
4. PhD Ines Panjkota Krbavčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 15 July 2020

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. HELJDA (lat. <i>Fagopyrum esculentum</i>).....	2
2.1.1. Obilježja heljde	2
2.1.2. Hranjiva vrijednost heljde	4
2.2. VLAKNA	4
2.2.1. Podjela vlakana	5
2.2.2. Svojstva vlakana.....	6
2.2.3. Utjecaj prerade na svojstva vlakana	8
2.3. ENZIMI	9
2.4. KRIOMLJEVENJE	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU	11
3.2. METODA ODREĐIVANJA UDJELA VLAKANA	14
3.2.1. Određivanje netopljivih vlakana (IDF)	17
3.2.2. Određivanje vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 %-tnom etanolu (SDFP)	18
3.2.3. Određivanje vlakana topljivih u vodi i u 78 %-tnom etanolu (SDFS)	20
3.3. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA.....	21
3.4. ODREĐIVANJE PEPELA.....	23
3.5. ODREĐIVANJE UDJELA VODE / SUHE TVARI POSTUPKOM SUŠENJA	24
3.6. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE.....	24
3.7. Statistička obrada.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UTJECAJ UZORKA, VREMENA TRETMANA, UDJELA ENZIMA, INTERAKCIJE NA UDJEL NETOPLJIVIH I TOPLJIVIH VLAKANA	26
4.2. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE.....	44
5. ZAKLJUČAK	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Heljda je pseudožitarica koja sadrži proteine uravnoteženog aminokiselinskog sastava, bogata je lizinom koji je važan za izgradnju proteina u ljudskom organizmu. Predstavlja izvor energije zbog škroba te sadrži vlakna i lipide bogate nezasićenim mastima (Zhu i sur., 2014). Nusproizvodi nastali tijekom obrade zrna heljde, kao što su ljuske, zbog visokog udjela vlakana mogu se koristiti kao sirovina za proizvodnju proizvoda s visokim udjelom vlakana (Dziedzic i sur., 2012).

U današnje vrijeme unos vlakana u prosjeku je i dalje znatno niži od preporučene dnevne doze te je zbog toga nužno dodavati vlakna u prehrambene proizvode (Zhu i sur., 2014).

Vlakna se dijele na topljiva i netopljiva te ovisno o tome imaju i različite pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Povećan unos vlakna može imati povoljne učinke kod kardiovaskularnih bolesti, divertikuloze, dijabetesa, raka debelog crijeva kao i kod drugih kroničnih bolesti (Abdul-Hamid i Luan, 2000). Fiziološki učinak vlakana prije svega ovisi o podrijetlu, omjeru pojedinih frakcija, stupnju usitnjavanja sirovina te primijenjenim termičkim procesima. Tehnološki postupci koji se primjenjuju u obradi heljde mogu utjecati na udjel i sastav vlakana kao i na funkcionalna svojstva (Dziedzic i sur., 2012). Kako bi se poboljšala funkcionalnost vlakana, na fizikalno-kemijska svojstva vlakana može se utjecati različitim tretmanima poput kemijskog, enzimatskog tretmana, mehaničkog tretmana poput mljevenja, tretmana toplinom ili termo-mehaničkog tretmana (Dhingra i sur., 2012).

Cilj ovog rada bio je istražiti kako kriomljevenje, odnosno različita veličina čestica i enzimski tretman pri različitom udjelu enzima i vremenu trajanja utječu na udjel netopljivih vlakana, na udjel vlakana netopljivih u 78 %-tnom etanolu, a topljivih u vodi te na udjel vlakana topljivih u 78 %-tnom etanolu i vodi u uzorcima ljusaka heljde. Također istražiti će se i utjecaj kriomljevenja na hidratacijska svojstva vlakana, odnosno na kapacitet zadržavanja vode (engl. *Water Retention Capacity*, WRC).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HELJDA (lat. *Fagopyrum esculentum*)

Heljda pripada porodici *Polygonaceae* i rodu *Fagopyrum*. U rodu *Fagopyrum* ima 15 biljnih vrsta, a gospodarsko značenje imaju samo tri vrste: obična heljda (lat. *Fagopyrum esculentum*), tatarska heljda (lat. *Fagopyrum tataricum*) i višegodišnja heljda (lat. *Fagopyrum cymosum*). Postoje diploidini ($2n = 16$) i tetraploidni oblici ($2n = 32$) heljde. Tetraploidna heljda ima veću masu, krupnije zrno i veće prinose zrna od diploidne (Kovačević i Rastija, 2014).

Heljda se koristi kao žitarica jer je njezina sjemenka bogata škrobom, ali s obzirom na to da nema zajedničkih bioloških svojstava sa žitaricama ubraja se u tzv. „pseudožitarice“. Sjemenka heljde sadrži 13–15 % proteina vrlo povoljnog aminokiselinskog sastava s više lizina te ostalih esencijalnih aminokiselina u odnosu na druge žitarice. Također ima povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje te se koristi u farmaceutskoj industriji za dobivanje glikozida rutina koji zaustavlja krvarenje, smanjuje krvni tlak i razinu kolesterola u krvi (Kovačević i Rastija, 2014). Heljda zbog snažne ekološke prilagodljivosti može rasti i u nepovoljnom okruženju. Zahtijeva manje vode i manje hranjivih tvari iz tla za razliku od ostalih usjeva te može rasti na mjestima s niskom temperaturom i s malo oborina (Li i Zhang, 2001). Heljda je i medonosna biljka i kao takva koristi se za ispašu pčela, a s jednog hektara može se dobiti 125 do 300 kg meda (Kovačević i Rastija, 2014).

2.1.1. Obilježja heljde

Korijen heljde vretenastog je oblika dužine 80–120 cm, a iz njega izbija mnoštvo žila i žilica. Korijen čini samo 3 % ukupne težine biljke (Kovačević i Rastija, 2014). Korijenski sustav heljde ima značajnu fiziološku aktivnost, izlučuje mravlju, octenu, limunsku i oksalnu kiselinu koje pomažu biljci da se opskrbi hranjivim tvarima, uglavnom fosforom (Vojtišková i sur., 2012). Glavna stabljika je čvrsta, šuplja i uspravna, visine 50–300 cm. Većinom je razgranata, no može biti i bez bočnih grana. Sorte s antocijanom imaju crvenkastu boju stabljike koja u zriobi prelazi u smeđu. Plodni dio stabljike i grana na kojima se grupiraju cvjetovi otvorenog tipa čine grozdastu cvat (lat. *corymbus*) (Kovačević i Rastija, 2014).

Listovi na stabljici smješteni su jedan nasuprot drugome, široki su i srcolikog oblika, dugi 5 – 10 cm. Donji listovi imaju peteljke i kratke zaliske, a gornji su sjedeći. Boja listova također može biti crvenkasta (Kovačević i Rastija, 2014).

Cvijet heljde sastoji se od 5 lapova, 5 latica, 8 prašnika i jednog tučka, a cvjetovi su skupljeni na cvjetnoj grančici (grozdasta cvat). Latice su bijele ili ružičaste nijanse. Cvjetovi su dvospolni i postoje dva tipa (heterostilija) – jedni su s prašnicima dužim od tučka, a drugi s kraćim prašnicima, pa je to stranooplodna biljka. Heljda stvara velik broj cvjetova (1000–2000), a cvatnja i oplodnja traju dugo, od 30 do 60 dana, da se oplodi samo oko 20 % cvjetova (Kovačević i Rastija, 2014). Na Slici 1 vide se bijeli cvjetovi heljde, sa stabljikom i zelenim listovima.



Slika 1. Heljda (Anonymous 1, 2019)

Plod heljde, oraščić u obliku prizme, pokriven je čvrstom ljuskom koja je prirasla uz sjeme i čini 18–40 % ukupne težine ploda (Slika 2). Sjemenka unutar ljuske također je prizmatičnog oblika, tamnosmeđe boje, a endosperm je bijele boje, neproziran sa sadržajem škroba kao i žitarice, a u sredini endosperma smještena je klica (Kovačević i Rastija, 2014). Ljuska je manje gustoće od vode, a to olakšava odstranjenje sjemenke iz ljuske (Li i Zhang, 2001).



Slika 2. Plod heljde (Anonymous 2, 2015)

2.1.2. Hranjiva vrijednost heljde

Heljda je bogata hranjivim tvarima, sadrži proteine ($1\text{--}1,25\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), škrob ($6,5\text{--}7,5\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$), masti ($0,20\text{--}0,25\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$) i mineralne tvari ($0,20\text{--}0,25\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$). Mineralni sastav heljde čine elementi poput željeza, cinka, fosfora, bakra, kalcija, joda. Mineralne tvari nalaze se u vanjskom omotaču sjemena i u ljusci (Li i Zhang, 2001). Također heljda je bogata vlaknima te zbog toga ima pozitivan učinak na gastrointestinalni trakt i značajno utječe na metabolizam drugih hranjivih tvari. Sjeme heljde ne sadrži gluten te je sigurno za konzumaciju za ljude oboljele od celijakije (Vojtišková i sur., 2012). Jestivi dijelovi sjemenki heljde sadrže visokokvalitetne proteine s visokim udjelom lizina i arginina, te uspoređujući proteine heljde s kazeinom i proteinima drugih biljaka, ekstrakti proteina heljde mogu smanjiti razinu kolesterola u krvi, točnije razinu LDL-kolesterola i VLDL-kolesterola (Li i Zhang, 2001).

2.2. VLAKNA

Vlakna su onaj dio biljnog materijala koji je u ljudskoj probavi otporan na enzimatsku razgradnju te uključuje celulozu, necelulozne polisaharide (hemiceluloza, pektin, guma, guma arabika) i lignin (Dhingra i sur., 2012). Netopljiva vlakana povezuju se s regulacijom rada crijeva, a topljiva se vlakna povezuju sa smanjenjem razine kolesterola u krvi i apsorpcijom crijeвне glukoze (Rossel i sur., 2009).

Hrana bogata vlaknima, poput voća, povrća i cjelovitih žitarica povezuje se sa smanjenjem rizika od različitih kroničnih bolesti, a istraživanjem se pokazalo da utječe na smanjenje rizika od dijabetesa (tip II) i kardiovaskularnih bolesti, smanjuje krvni tlak te poboljšava razinu masnoća u krvi. Hrana s visokim udjelom vlakana može doprinijeti značajnom poboljšanju ljudskog zdravlja (Zhang i sur., 2018).

Vlakna se obično dodaju u prehrambene proizvode kako bi se poboljšale hranjive vrijednosti, kao i tekstura, boja, aroma i okus hrane. Vlakna visokog antioksidativnog djelovanja mogu se dodati u namirnice bogate mastima kako bi se poboljšala oksidativna stabilnost i produljio rok trajanja (Elleuch i sur., 2011).

2.2.1. Podjela vlakana

Vlakna se mogu klasificirati kao topljiva u vodi ili netopljiva u vodi. U vodi topljivim vlaknima pripadaju pektinske tvari, gume i sluzi, a celuloza, hemiceluloza i lignin pripadaju netopljivim vlaknima. Vlakna u hrani mogu se mijenjati kvalitativno i kvantitativno ovisno o stupnju zrelosti biljnog materijala (Roehrig, 1988).

Pektinske tvari grupa su složenih polisaharida gdje je D-galakturonska kiselina sastavni dio. Strukturne su komponente biljne stanične stijenke i djeluju kao međustanične gradivne tvari (Kay, 1982). Pektin je djelomično metoksilirani polimer galakturonske kiseline, a komercijalno se dobiva iz jabuka i citrusnog voća. Jako se dobro otapa u vodi i gotovo ga u potpunosti metaboliziraju bakterije debelog crijeva. Zbog svojstva želiranja, pektinske tvari mogu smanjiti brzinu pražnjenja želuca i utjecati na vrijeme prolaska kroz crijeva, a to objašnjavaju njihova hipoglikemijska svojstva (Jenkins i sur., 1987).

Biljna vlakna koja nastaju u specijaliziranim sekretornim biljnim stanicama koja nisu dio stanične stijenke su gume i sluzi. Gume i sluzi jako su razgranati polisaharidi koji stvaraju gelove, vežu vodu i druge organske materijale. Gume su ljepljive izlučevine koje nastaju kao odgovor na traumu (guma arabika), uglavnom se sastoje od guar gume i gume arabike. Guar guma je galaktomanan izoliran iz sjemena biljke *Cyamopsis tetragonolobus*, a djelomičnom enzimskom hidrolizom daje produkt koji se može koristiti kao topljivo vlakno. Takvo vlakno ima iste fiziološke učinke poput topljivih vlakana. Guma arabika složen je polisaharid arabinogalaktana u smjesi s glikoproteinom, te se izdvaja iz bagremova drveta (Dhingra i sur., 2012). Sluz se izlučuje u endosperm biljnog sjemena te djeluje na sprečavanje prekomjerne dehidratacije biljke (Kay, 1982). Guar guma i pektin koriste se kao zgušnjivači u prehrambenoj industriji (Jenkins i sur., 1978).

Sastavni dio stanične stijenke u biljkama je celuloza, nerazgranati linearni lanac sastavljen od nekoliko tisuća jedinica glukoze koje su povezane β -1,4 glikozidnom vezom. Mehanička čvrstoća, otpornost na biološku razgradnju, niska topljivost u vodi i otpornost na hidrolizu kiselinom svojstva su celuloze koja je rezultat vezanja vodika unutar mikrofibrila (Dhingra i sur., 2012).

Hemiceluloza je polisaharid, heterogeni polimer šećerne kiseline, pentoza (arabinoza i ksiloza) i heksoza (glukoza, galaktoza, manoz). Visoko je razgranati polimer koji nije kristalan, a u prirodi je sastav hemiceluloze neujednačen, a to ovisi o prirodi biljnog izvora (Sajith i sur., 2016). Hemiceluloza sadrže okosnice glukoznih jedinica povezanih β -1,4 glikozidnom vezom, no za razliku od celuloze, manje su veličine, sadrže razne šećere i većinom su razgranati. Hemiceluloza sadrži uglavnom ksilozu i nešto galaktoze, manoze, arabinoze i drugih šećera (Kay, 1982).

Lignin je složeni polimer kojeg čine fenilpropanske jedinice kao što su kumarilni alkohol, koniferilni alkohol i sinapilni alkohol povezani u trodimenzionalnu strukturu koju je teško razgraditi. Lignini daju krutost tijelu biljke i igraju ključnu ulogu u transportu tekućine i sprečavanju prodiranja mikroba (Sajith i sur, 2016). Lignini se razlikuju u molekularnoj težini i sadržaju metoksila. Zbog snažne intramolekularne veze koja uključuje ugljik–ugljik vezu, lignin je jako inertan i pokazuje veću otpornost od bilo kojeg drugog polimera u prirodi (Kay, 1982).

2.2.2. Svojstva vlakana

Fizikalno-kemijska svojstva imaju važnu ulogu u funkcionalnosti vlakana te ograničavaju njihovu upotrebu kao prehrambeno-tehnoloških čimbenika. Pojava novih izvora vlakana, kao i novih metoda obrade za poboljšanje njihove funkcionalnosti, proširili su primjenu vlakana u prehrambenoj industriji i otvorili nove mogućnosti za razvoj proizvoda obogaćenih vlaknima i za stvaranje novih tekstura za različitu primjenu. Vlakna mogu mijenjati konzistenciju, teksturu, reološka svojstva i senzorske karakteristike prehrambenih proizvoda (Rosell i sur., 2009).

Veličina čestica igra važnu ulogu u kontroliranju procesa koji se odvijaju u probavnom traktu, kao što je vrijeme prolaska kroz probavni trakt, fermentacija, izlučivanje fekalija. Raspon veličine čestica ovisi o vrsti staničnih stijenki prisutnih u hrani i o stupnju njihove obrade. Veličina čestice vlakana može varirati tijekom prolaska kroz probavni trakt kao rezultat žvakanja, mljevenja i razgradnje bakterija u debelom crijevu (Gullion i Champ, 2000).

Nadalje, poroznost te dostupna površina vlakana mogu utjecati na njihovu fermentaciju, odnosno utječu na mikrobnu razgradnju u debelom crijevu. Poroznost i površina dostupna bakterijama ili enzimima ovisi o strukturi vlakana koja se povezuje s podrijetlom i načinom prerade. Smanjenje volumena pora ima veći utjecaj na površinsku dostupnost za bakterije, usporedno s površinskom dostupnošću za enzime (Gullion i sur., 1998).

Hidratacijska svojstva djelomično određuju sudbinu vlakana u probavnom traktu te objašnjavaju neke fiziološke učinke vlakana (Gullion i Champ, 2000). Hidratacijska svojstva vlakana mjere se pomoću četiri hidratacijska parametra: bubrenja, topljivosti, kapaciteta zadržavanja vode primjenom vanjske sile (engl. *Water Retention Capacity*, WRC) i kapaciteta zadržavanja vode bez primjene vanjske sile (engl. *Water Holding Capacity*, WHC). Bubrenje vlakana usko je povezano s njihovom topljivošću. Povećanjem temperature, povećava se i bubrenje vlakana (Thibault i sur., 1992). Bubrenje i sposobnost zadržavanja vode pružaju općeniti prikaz hidratacije vlakana i daju korisne informacije za vlakna koja se dodaju u hranu. Adsorpcija vode može pružiti više informacija o vlaknima kao i o volumenu pora, a to može pomoći boljem razumijevanju ponašanja vlakana u hrani ili tijekom prolaska kroz crijeva (Gullion i Champ, 2000). Na hidratacijske parametre vlakana, poput WRC-a i bubrenja utječe ionska jakost, pri čemu će visoka ionska jakost u otapalu smanjiti WRC. Također ioni prisutni u vlaknima mogu utjecati na bubrenje i WRC, ovisno o vrsti vlakana. Na hidrataciju vlakana može utjecati i veličina čestica, kao i enzimski tretman vlakana, sušenje, kuhanje, ekstruzija (Thibault i sur., 1992). Hidratacija vlakna nastaje adsorpcijom na površinu makromolekule unutar međuprostora vlaknaste matrice ili gel-matrice. Kapacitet zasićenja vlakna ili gornja granica zadržane vode određena je kemijom i morfologijom makromolekula te pH-vrijednosti i elektrolitima u okruženju (Kay, 1982). Maksimalna količina vode koju vlakna mogu zadržati ovisi o izvoru vlakana, načinu mjerenja i pripreme, kao i njihovim fizikalno-kemijskim i strukturnim karakteristikama. Hidratacijska svojstva vlakana određuju njihovu optimalnu razinu uporabe u hrani kako bi se zadržala određena tekstura (Raghavendra i sur., 2006).

Na topljivost vlakana utječe struktura polisaharida, kao i temperatura i ionska jakost. Topljiva i netopljiva vlakna razlikuju se u fiziološkim učincima i tehnološkoj funkcionalnosti. Vlakna topiva u vodi utječu na povećanje viskoznosti otopine (Abdul-Hamid i Luan, 2000). Ako je polisaharidna struktura takva da se molekule spajaju zajedno u kristalnom nizu, polimer će biti energetski stabilniji u čvrstom stanju nego u otopini. Linearni polisaharidi koji u svojoj konformaciji sadrže masne vrpce, poput celuloze, netopljivi su, a polisaharidi s određenim

nepravilnostima u strukturi ili razgranati polisaharidi (guar guma) obično su topljivi (Gullion i Champ, 2000).

Viskoznost je jedno od najlakše prepoznatljivih svojstava vlakana (Jenkins i sur., 1978). Viskoznost se može opisati kao otpor protoka nekog fluida. Povećanje molekulske mase ili povećanje duljine lanca utječu na viskozitet vlakana u otopini koji se također povećava. Polimeri dugog lanca poput guma (guar guma, tragakant guma) značajno vežu vodu i pokazuju visoku viskoznost otopine. Općenito, jako topljiva vlakna koja su jako razgranata ili su relativno kratki lanac polimera poput gume arabike, imaju nisku viskoznost. Tretmani koji utječu na smanjenje viskoznosti vlakana, također bi utjecali i na smanjenje korisnog fiziološkog učinka (Gullion i Champ, 2000).

2.2.3. Utjecaj prerade na svojstva vlakana

Različitim načinima prerade poput mehaničkog, kemijskog, toplinskog i enzimskog procesiranja mogu se poboljšati svojstva vlakana (Elleuch i sur, 2011).

Mehanička obrada poput miješanja, utjecat će na otvaranje strukture vlakana, a to će omogućiti slobodnim hidroksilnim skupinama celuloze vezanje s vodom (Sangark i Noomhorm, 2004). Mljevenje, također, može utjecati na svojstva vlakana. Mljevenjem se mijenja struktura vlakana, čime se povećava površina dostupna za apsorpciju vode te se može utjecati na povećanje ili smanjenje hidratacijskih svojstava ovisno o veličini čestica (Raghavendra i sur., 2006).

Enzimska hidroliza također je jedna od učestalih metoda koja se koristi za modifikaciju vlakana (Zhang i sur., 2018). Enzimskim tretmanom može se izmijeniti omjer topljivih i netopljivih vlakana. Tretiranjem staničnih zidova ksilanazom povećava se razina topljivih vlakana (Elleuch i sur., 2011). Dokazano je da enzimska ekstrakcija potpomognuta celulazom može povećati udjel topljivih vlakana i isto tako poboljšati fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva vlakana, poput sposobnosti zadržavanja vode, emulgirajuća svojstva, kapacitet ugradnje i adsorpcijsku sposobnost (Zheng i Li, 2018). Toplinski tretmani mogu utjecati na promjenu omjera između topljivih i netopljivih vlakana, udjela ukupnih vlakana i na promjenu njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Ove promjene ovise o vrsti biljnog materijala i načinu obrade (Elleuch i sur., 2011).

2.3. ENZIMI

Hemicelulaze su glikozidne hidrolaze ili esteraze ugljikohidrata predstavljene ksilanazama (EC 3.2.1.8), β -manazama (EC 3.2.1.78), arabinofuranozidazama (EC 3.2.1.55) i β -ksilozidazama (EC 3.2.1.37). Ksilan čini oko 70 % hemiceluloza, a hidrolizira ga ksilanaza do oligomera, koji se dalje razgrađuju na ksilozu β -ksilozidazama. Za potpunu degradaciju hemiceluloze potrebne su i druge hemicelulaze poput manaze i arabinaze, a to ovisi o kemijskom sastavu hemiceluloze (Sajith i sur., 2016). Ksilanaze djeluju prvenstveno na hemicelulozu, povećavajući sposobnost zadržavanja vode, moć bubrenja i apsorpciju ulja (Zhang i sur., 2018). Ksilanaza djeluje tako da smanjuje sadržaj celuloze i hemiceluloze u netopljivim vlaknima (Wen i sur., 2017).

Celulaza je ključni enzim za pretvorbu celuloze u jednostavne šećere. Enzim je koji hidrolizira β -1,4-glikozidne veze celuloze i drugih srodnih derivata celooligosaharida. Za postizanje razgradnje netaknute vodikove veze celuloze potrebno je sinergističko djelovanje tri glavne vrste enzima poput endoglukanaze (EC 3.2.1.4), egzoglukanaze (EC 3.2.1.91) i β -glukozidaze (EC 3.2.1.21) (Sajith i sur., 2016). Celulaze djeluju tako da pretvaraju netopljiva u topljiva vlakna kako bi se povećala topljivost vlakana u vodi (Zhang i sur., 2018).

Endoglukanaze hidroliziraju amfornu (unutarnju) regiju fibrila nasumičnim cijepanjem β -glukozidnih veza. Celobiohidralaze su egzoglukanaze koje oslobađaju celobiozu s kraja lanca, dok β -glukozidaze dovršavaju proces razgradnje hidroliziranjem celobioze i drugih celodekstrina s malim stupnjem polimerizacije u glukozne jedinice. Celulaze su značajane za industrijsku primjenu, posebno u sektorima hrane, kemikalija, deterdženata, kozmetike, pulpe i papira (Sajith i sur., 2016).

2.4. KRIOMLJEVENJE

Kriomljevenje je proces mljevenja u prisutnosti kriogenih tekućina poput tekućeg dušika čija je temperatura $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Niska temperatura tekućeg dušika tijekom kriomljevenja osigurava hlađenje potrebno za prethodno hlađenje uzorka i održavanje željene niske temperature apsorpiranjem topline koja se stvara tijekom mljevenja (Singh i Goswami, 2000). Tekući dušik ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) jedan je od najhladnijih tvari, potpuno inertan, bezbojan, bez okusa i mirisa te bez štetnih utjecaja na okoliš (Balasubramanian i sur., 2012).

Kriomljevenje predstavlja učinkovitu tehniku za proizvodnju praha s nanočesticama. Tehnika uključuje mljevenje pomoću kuglica i tekućeg dušika ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zbog kriogene temperature i

intenzivnog mljevenja kuglicama, veličina izvornog praha u relativno se kratkom vremenu smanjuje na nanorazinu (Back i sur., 2005).

Primjenom kriomljevenja u prehrambenoj industriji dobivaju se prehrambeni proizvodi visoke kvalitete, zadržava se željeni izgled, čuvaju se ljekovita i aromatična svojstva začina, ljekovitog bilja i drugih prehrambenih proizvoda te je potrošnja energije manja u usporedbi s tradicionalnim sustavima mljevenja. Brže smanjenje temperature i stvaranje okruženja niske temperature isparavanjem tekućeg dušika daje sirovinama željene karakteristike (Balasubramanian i sur., 2012). Također mljevenje s tekućim dušikom može smanjiti gubitak mnogih bioaktivnih komponenti i dodaje novu vrijednost prilikom ispunjavanja zahtjeva za prirodnim antioksidansima u hrani (Kaur i Srivastav, 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Korištene heljdine ljske prethodno su samljevene na ciklolinu, a zatim na kriomlinu. Nakon provedenog mljevenja na kriomlinu dio samljevenog uzorka nije prosijavan, a dio je prenesen na tresilicu sa sitom veličine pora 56 μm . Neprosijane čestice ponovno su mljevene na kriomlinu i postupak je ponavljan sve dok sve čestice nisu bile manje od $< 56 \mu\text{m}$. Uzorci su tretirani enzimima (celulazom i hemicelulazom) te su postavljeni u vodenu kupelj s tresilicom u različitim vremenskim intervalima (1 h, 4 h, 8 h). Po završetku enzimskog tretmana provedena je inaktivacija enzima, a nakon toga, uzorci su smrznuti pri $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, potom liofilizirani.

Određivanje udjela netopljivih vlakana (IDF), udjela vlakana netopljivih u 78 %-tnom etanolu, a topljivih u vodi (SDFP) te udjela vlakana topljivih u 78 %-tnom etanolu i vodi (SDFS) u uzorcima ljsaka heljde provedeno je koristeći se metodom AOAC 2011.25. Uzorak se inkubira s gušteračinom α -amilazom i amiloglukozidazom 16 sati na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Reakcija se zaustavlja prilagođavanjem pH na 8,2 i kratkim zagrijavanjem. Proteini u uzorku se zatim denaturiraju i razgrađuju proteazom. Reakcijska otopina se filtrira, a u zaostalom talogu su netopljiva vlakna koja se ispiru, suše i važu. Zatim vlakna netopljiva u etanolu, a topljiva u vodi, zaostala u filtratu potom se talože sa 78 %-tnim etanolom, a talog se potom filtrira, suši i važe. Masa obaju taloga korigira se s obzirom na to koji je udjel proteina i pepela. Preostali filtrat se koncentrira, potom deionizira, otopi u vodi te se udjel vlakana topljivih u vodi i etanolu odredi HPLC-RI metodom.

Određivan je i kapacitet zadržavanja vode. Uzorcima se dodaje voda te se ostave 18 h kako bi uzorak hidrirao. Nakon provedene hidracije uzorci se centrifugiraju, a supernatant uklanja se vakuum filtracijom. Lončić s hidriranim ostatkom se važe, zatim suši na $105 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 2 h, te se ponovno važe nakon hlađenja.

3.1. PRIPREMA UZORKA ZA ANALIZU

U ovom radu korištene su heljdine ljske proizvođača Pukanić, Hrvatska, prvo samljevene na ciklolinu (Retsch ZM200, Njemačka) na veličinu čestica $< 500 \mu\text{m}$ i pri brzini 6000 RPM, a zatim na kriomlinu. Kriomljevanje heljdinih ljsaka provedeno je na kriomlinu (Retsch Cryomill, Njemačka) u trajanju od 8 minuta, frekvencije 30 Hz uz prethodno hlađenje tekućim dušikom ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) u trajanju od 5 minuta. Dio samljevenog uzorka (uzorak 8' KM) nije prosijavan, a dio je prenesen na tresilicu (Analysette 3PRO, Njemačka) sa sitom veličine pora 56 μm . Neprosijane čestice ponovno su mljevene na kriomlinu i postupak je ponavljan dok sve čestice nisu bile $< 56 \mu\text{m}$ (uzorak KM $< 56 \mu\text{m}$).

Nakon toga uzorci su tretirani enzimima, celulazom (Alphamalt C 21032, Mühlenchemie GmbH & Co. KG, Njemačka) i hemicelulazom (5000 HCU/g, BIO-CAT, SAD). Izvagano je oko 10 g uzorka u Duran boci te dodano je 50 mL NaAc pufera (0,1 M, pH = 5), nakon čega su inaktivirani prisutni enzimi u uzorku, u vodenoj kupelji 10 minuta pri temperaturi iznad 90 °C. Uzorci su ohlađeni na temperaturu od oko 50 °C. Nakon hlađenja uzorcima je dodano 0,1 % ili 1 % oba enzima (hemicelulaza + celulaza). Enzimi se odvažu na aluminijsku foliju (0,01 g ili 0,1 g) te su dodani ispiranjem folije s 40 mL natrij-acetatnog pufera (ukupno dodano u uzorak 90 mL pufera) te su promiješani na magnetskoj miješalici (oko 2 minute), nakon čega su uzorci postavljeni u vodenu kupelj s tresilicom (Stuart SBS40) na 50 °C, u različitim vremenskim intervalima (1 h, 4 h, 8 h). Kontrolnim uzorcima 8'KM i < 56 µm dodano je 90 mL natrij-acetatnog pufera te su podvrgnuti inaktivaciji enzima, kao i ostali uzorci.

Po završetku enzimskog tretmana provedena je inaktivacija enzima stavljanjem uzoraka u vodenu kupelj na temperaturu iznad 90 °C tijekom 10 minuta. Nakon inaktivacije, uzorci su smrznuti pri -80 °C, potom liofilizirani (Alpha 1-4 LSCplus, Njemačka) te su čuvani na temperaturi -20 °C do analize. U Tablici 1 prikazani su analizirani uzorci heljdinih ljusaka, a u Tablici 2 prikazani su opisi analiziranih uzoraka.

Tablica 1. Uzorci heljdinih ljusaka korišteni za analizu

Uzorak	Udjel enzima (%)	Vrijeme tretmana (h)
8'KM 0	0	0
8'KM 1 h E 0,1 %	0,1	1
8'KM 1 h E 1 %	1	1
8'KM 4 h E 0,1 %	0,1	4
8'KM 4 h E 1 %	1	4
8'KM 8 h E 1 %	0,1	8
8'KM 8 h E 1 %	1	8
< 56 µm 0	0	0
< 56 µm 1 h E 0,1 %	0,1	1
< 56 µm 1 h E 1 %	1	1
< 56 µm 4 h E 0,1 %	0,1	4
< 56 µm 4 h E 1 %	1	4
< 56 µm 8 h E 1 %	0,1	8

Tablica 1. Uzorci heljdinih ljusaka korišteni za analizu - nastavak

Uzorak	Udjel enzima (%)	Vrijeme tretmana (h)
< 56 μm 8 h E 1 %	1	8

Tablica 2. Opis analiziranih uzoraka heljdinih ljusaka korištenih za analizu

Uzorak	Opis uzorka
8'KM 0	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, bez dodatka enzima
8'KM 1 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 1 h.
8'KM 1 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 1 h.
8'KM 4 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 4 h.
8'KM 4 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 4 h.
8'KM 8 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 8 h.
8'KM 8 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu 8 minuta, tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 8 h.
< 56 μm 0	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 μm , bez dodatka enzima.
< 56 μm 1 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 μm , tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 1 h.
< 56 μm 1 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 μm , tretiran enzimom (1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 1 h.
< 56 μm 4 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 μm , tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 4 h.
< 56 μm 4 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 μm , tretiran enzimom (1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 4 h.

Tablica 2. Opis analiziranih uzoraka heljdinih ljusaka korištenih za analizu - nastavak

Uzorak	Opis uzorka
< 56 µm 8 h E 0,1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 µm, tretiran enzimom (0,1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 8 h.
< 56 µm 8 h E 1 %	Uzorak samljeven na kriomlinu do veličine čestica < 56 µm, tretiran enzimom (1 %) i podvrgnut enzimskom tretmanu u trajanju 8 h.

3.2. METODA ODREĐIVANJA UDJELA VLAKANA

Udjel vlakna u analiziranim uzorcima određen je pomoću enzimsko-gravimetrijske metode i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom indeksa refrakcije (engl. *High Performance Liquid Chromatography - Refractive Index Detector*, HPLC-RI). Određivanje udjela netopljivih vlakana (IDF), udjela vlakana netopljivih u 78 %-tnom etanolu, a topljivih u vodi (SDFP) te udjela vlakana topljivih u 78 %-tnom etanolu i vodi (SDFS) u uzorcima ljusaka heljde provedeno je koristeći se metodom AOAC 2011.25.

Princip metode:

Uzorak se inkubira s gušteračinom α -amilazom i amiloglukozidazom 16 sati na temperaturi od 37 °C. Tijekom inkubacije s enzimima, rezistentni škrob se otapa i hidrolizira do D-glukoze, maltoze i djelomično rezistentnih maltodekstrina u tragovima. Reakcija se zaustavlja prilagođavanjem pH na 8,2 i kratkim zagrijavanjem. Proteini u uzorku se zatim denaturiraju i razgrađuju proteazom. Reakcijska otopina se filtrira, u zaostalom talogu su netopljiva vlakna koja se ispiru, suše i važu. Zatim vlakna netopljiva u etanolu, a topljiva u vodi, zaostala u filtratu potom se talože 78 %-tnim etanolom, a talog se potom filtrira, suši i važe. Masa obaju taloga korigira se s obzirom na to koji je udjel proteina i pepela. Preostali filtrat se koncentrira, potom deionizira, otopi u vodi te se udjel vlakana topljivih u vodi i etanolu odredi HPLC-RI metodom (Megazyme, 2018).

Kemikalije:

- etanol, 95 % (Kefo) i 78 %
- aceton, p.a. (Gram-mol)
- celit, analitička čistoća (Megazyme)
- natrij-maleatni pufer

- priprema: u odmjerne tikvici od 1 L otopi se 5,8 g maleinske kiseline ($\geq 99\%$, ReagentPlus, Sigma-Aldrich) u oko 800 mL vode, pH se podesi na 6, 4 M otopinom NaOH, zatim se doda 0,3 g kalcijeva klorida dihidrata (Sigma-Aldrich), volumen se podesi dodatkom vode do oznake
- Trizma bazična otopina, 0,75 M
 - priprema: otopi se 90,8 g Trizma® Base (Sigma cat. No. T-1503) u oko 800 mL deionizirane vode te se volumen podesi na 1 L
- octena kiselina, 2 M
 - priprema: 115 mL ledene octene kiseline (99,5 %, Macron) pipetira se u odmjernu tikvicu volumena 1 L te se do oznake razrijedi s deioniziranom vodom
- pankreasna α -amilaza, 50 jedinica mL⁻¹ (Megazyme kit)
- amiloglukozidaza 3300 jedinica mL⁻¹, otopljena u 50 %-tnom (v/v) glicerolu (Megazyme kit)
- proteaza, 50 mg mL⁻¹, 350 jedinica mL⁻¹ tirozina, otopljena u 50 %-tnom (v/v) glicerolu, (Megazyme kit)
- D-sorbitol, interni standard, 100 mg mL⁻¹, vodena otopina (Megazyme kit)
- ion-izmjenjivačke smole
 - Amberlite 200CNa (ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow)
 - aktivacija natapanjem 30 minuta u dvostruko većem volumenu 7 % HCl, potom ispiranje
 - Amberlite FPA53 (ROHM AND HAAS FRANCE S.A.S., Dow)
- Na₂CaEDTA ($\geq 97,0\%$, Fluka)

Uređaji i ostali pribor:

- mufolna peć, KR170, W. C. HERAEUS HANAU
- sušionik, ST-01/02, Instrumentaria
- analitička vaga, ALS220-4N, Kern
- magnetna miješalica, RT 5, IKA-WERKE
- vodena kupelj s treslicom, SBS40, Stuart
- pH-metar, 3510, Jenway
- vakuumska pumpa

- rotavapor, Hiedolph
- termometar
- HPLC uređaj, Shimadzu
 - pumpa LC-10AD, Shimadzu
 - odzračivač DGU-14A, Shimadzu
 - pećnica CTO-10AS, Shimadzu
 - detektor indeksa loma RID-10A, Shimadzu
 - program LCsolution Version 1.22 SP1, Shimadzu
- staklene Duran boce s čepom (250 mL, 500 mL, 1 L)
- eksikator
- špatula
- odmjerne tikvice
- staklena čaša
- menzura (50 mL, 100 mL, 1 L)
- set magneta
- graduirana pipeta (20 mL)
- automatska propipeta
- lončići za filtraciju Duran 2
- odsisna boca
- stakleni adapter za lončiće za filtraciju
- gumeni prsten
- plastične Falcon epruvete (15 mL, 50 mL)
- plastične Eppendorf epruvete (2 mL)
- plastične šprice (2 mL)
- filter za špicu (0,45 μm)
- manifold s kolonama za deionizaciju
- vata

Priprema lončića za filtraciju:

Lončići za filtraciju stave se u 2 %-tnu otopinu za čišćenje 1 h, na sobnu temperaturu. Nakon namakanja lončići se temeljito isperu u vodi, zatim se ispiru pod vakuumom, prvo vodom, a nakon toga acetonom (15 mL). Kada se lončići osuše na zraku, doda se 1 g celita i potom se spaljuju u mufolnoj peći na 525 °C, 7 h, nakon čega se hlade u eksikatoru i važu.

Priprema uzorka:

Odvažuje se $1 \pm 0,0001$ g uzorka u dvije paralele, te se uzorak navlaži 95 %-tnim etanolom (1 mL) i doda se magnet. U uzorak se doda 40 mL maleatnog pufera s enzimima (50 jedinica mL^{-1} pankreasne α -amilaze i 3,4 jedinice mL^{-1} amiloglukozidaze). Uzorci se inkubiraju u vodenoj kupelji tresilicom 16 h na temperaturi od 37 °C, uz orbitalno miješanje brzinom 12 okr. min^{-1} . Nakon inkubacije uzorci se izvade iz kupelji, te se u uzorke doda 3,0 mL 0,75 M trizma bazične otopine i uzorci se pomiješaju na magnetnoj miješalici. Boce s uzorcima postavljaju se u vodenu kupelj na temperaturu iznad 90 °C tijekom 20 minuta. Svakih 5 minuta boce s uzorcima trebaju se lagano promiješati. Uzorci se nakon tretiranja u vodenoj kupelji trebaju ohladiti na 60 °C te se doda 100 μL otopine proteaze i postavljaju se u vodenu kupelj s tresilicom na 30 min pri 60 °C. Uzorcima se odmah, nakon što se izvade iz kupelji doda 4 mL 2 M octene kiseline i 1 mL otopine sorbitola, uzorci se homogeniziraju na magnetskoj miješalici te nakon toga slijedi filtracija pod vakuumom.

3.2.1. Određivanje netopljivih vlakana (IDF)

Prethodno pripremljen lončić s celitom namoči se 78 %-tnim etanolom (oko 15 mL) pomoću boce štrcaljke, špatulom se promiješa kako bi se celit poravnao i potom se osuši pod vakuumom. Uzorak se kvantitativno prenosi na tako pripremljen lončić s celitom. Boca u kojoj je bio uzorak ispiru se destiliranom vodom zagrijanom na 60 °C sedam puta po 5 mL. Sakupljeni filtrat prenese se u menzuru i volumen se podese na 85 mL dodavanjem nekoliko kapi destilirane vode, te se prenese u Duran bocu od 500 mL i čuva se za određivanje topljivih vlakana. Lončić na kojemu je zaostao uzorak ispiru se po dva puta 78 %-tnim etanolom (15 mL), 95 %-tnim etanolom (15 mL) i acetonom (15 mL). Lončić s uzorkom prekriven aluminijskom folijom stavlja se u sušionik preko noći na sušenje pri 105 °C, a nakon hlađenja u eksikatoru se važe. Od dvije paralele, jedan lončić izdvoji se za određivanje proteina, a jedan za određivanje pepela. Lončići koji su odvojeni za određivanje pepela spaljuju se u mufolnoj peći pri 525 °C, hlade u eksikatoru i važu. Proteini se određuju metodom po Kjeldahlu.

Masa netopljivih vlakana (IDF) izračuna se prema jednadžbi [1]:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [1]$$

gdje je:

m_1 – masa IDF-a u uzorku (g)

m_2 – masa lončića s celitom (g)

m_3 – masa lončića s celitom i IDF-om u uzorku (g)

Masa IDF-a mora se korigirati s obzirom na to koji je udjel proteina i pepela (prema metodama u poglavljima 3.3. i 3.4.), a korekcija se provodi prema jednadžbi [2]:

$$m_2 = \frac{m_1 - \frac{\text{udjel proteina (\%)} \times m_1}{100} - \frac{\text{udjel pepela (\%)} \times m_1}{100} - sp}{m_3} \quad [2]$$

gdje je:

m_1 – masa IDF-a u uzorku (g)

m_2 – masa IDF-a korigirana za udjel proteina i pepela, u 1 g uzorka (g)

m_3 – masa uzorka uzetog za analizu (g)

sp – slijepa proba (g)

Udjel suhe tvari određen je prema metodi u poglavlju 3.5., a rezultat je izražen kao masa IDF-a u 100 g suhe tvari (g) prema jednadžbi [3]:

$$m (IDF) = \frac{m_1}{\text{udjel suhe tvari (\%)}} \times 100 \quad [3]$$

gdje je:

$m (IDF)$ – masa netopljivih vlakana u 100 g suhe tvari uzorka (g)

m_1 – masa IDF-a korigirana za udjel proteina i pepela, u 1 g uzorka (g)

3.2.2. Određivanje vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 %-tnom etanolu (SDFP)

Za određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) filtrat volumena 85 mL, nakon temperiranja od 10-ak minuta na 60 °C pomiješa se s 340 mL 95%-tnog etanola zagrijanog na 60 °C, promućka se i taloži na sobnoj temperaturi minimalno 1 h. Nakon taloženja, slijedi ponovna filtracija na vakuumskoj boci, preko prethodno pripremljenog lončića s celitom. Uzorak se kvantitativno prenese na lončić ispirući bocu 78 %-tnim etanolom. Sakupljeni filtrat čuva se za određivanje vlakana topljivih u vodi i 78 %-tnom etanolu. Lončić s talogom ispire se dva puta 78 %-tnim etanolom (15 mL), 95 %-tnim etanolom (15 mL) i acetonom (15 mL). Lončić se pokrije aluminijskom folijom i stavlja na sušenje u sušionik na 105 °C preko noći. Nakon sušenja, lončić s talogom hladi se u

eksikatoru i važe. U jednom preostalom talogu određen je udjel proteina, a u drugom udjel pepela. Uzorci koji su odvojeni za određivanje pepela mineraliziraju se u mufolnoj peći pri 525 °C do postizanja konstantne mase. Proteini se određuju metodom po Kjeldahlu, organske tvari iz uzorka razore se zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom uz dodatak katalizatora.

Masa vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 %-tnom etanolu (SDFP) računa se prema jednadžbi [4]:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [4]$$

gdje je:

m_1 – masa SDFP-a u uzroku (g)

m_2 – masa lončića s celitom (g)

m_3 – masa lončića s celitom i SDFP-om (g)

Masa SDFP-a mora se korigirati s obzirom na udjel proteina i pepela (prema metodama u poglavljima 3.3. i 3.4.), a korekcija je provedena prema jednadžbi [5]:

$$m_2 = \frac{m_1 - \frac{\text{udjel proteina (\%)} \times m_1}{100} - \frac{\text{udjel pepela (\%)} \times m_1}{100} - sp}{m_3} \quad [5]$$

gdje je:

m_1 – masa SDFP-a u uzroku (g)

m_2 – masa SDFP-a korigirana za udjel proteina i pepela, u 1 g uzorka (g)

m_3 – masa uzorka uzetog za analizu (g)

sp – slijepa proba (g)

Udjel suhe tvari određen je prema metodi u poglavlju 3.5., a rezultat je izražen kao masa SDFP-a u 100 g suhe tvari (g) prema jednadžbi [6]:

$$m(SDFP) = \frac{m_1}{\text{udjel suhe tvari (\%)}} \times 100 \quad [6]$$

gdje je:

$m(SDFP)$ – masa SDFP-a u 100 g suhe tvari uzorka (g)

m_1 – masa SDFP-a korigirana za udjel proteina i pepela, u 1 g uzorka (g)

3.2.3. Određivanje vlakana topljivih u vodi i u 78 %-tnom etanolu (SDFS)

Polu volumena sakupljenog filtrata upari se na rotavaporu pri 90 okretaja u minuti i temperaturi kupelji 60 °C. U suhi uzorak doda se 5 mL vode i uzorak se otopi pri vrtnji na rotavaporu dodatne 2 minute. Otopljeni uzorak prenese se u Falcon epruvetu od 10 mL te se čuva pri -18 °C do deionizacije.

Za deionizaciju potrebno je pripremiti ionsko-izmjenjivačke smole. U staklenu čašu izvaže se oko 4 g Amberlite FPA53 (OH⁻) smole i oko 4 g Ambersep 200 (H⁺) smole. Smolama se doda malo vode, smole se promiješaju i homogeniziraju te se sadržaj čaše prelije u kolonu za deionizaciju. Na vrh smole u koloni stavi se malo vate kako bi se spriječilo pomicanje smole kod ulijevanja uzorka i ispiranja kolone. Prije nego se doda uzorak, smole je potrebno isprati deioniziranom vodom (20 mL). Na kolonu se prenese 2 mL otopine uzorka, a kad uzorak uđe među smole, doda se 2 mL deionizirane vode na vrh kolone. Elucija se provodi brzinom 1 mL min⁻¹, a eluat se sakuplja u plastičnu Falcon epruvetu od 50 mL smještenu u posudu manifolda. Nakon što su uzorak i voda eluirali, dodaje se oko 20 mL deionizirane vode na vrh kolone koja eluira istom brzinom. Eluat se prebaci u tikvicu za uparavanje od 250 mL i upari do suhog na rotavaporu pri 60 °C. Uparenom uzorku doda se 2 mL deionizirane vode i uzorak se otopi uz vrtnju dodatne 2 minute na rotavaporu. Otopina se profiltrira kroz 0,45 µm filter i čuva pri -18 °C do HPLC analize.

SDFS se određuje na HPLC uređaju s RI detektorom pri sljedećim uvjetima analize:

- kolona: Metacarb 67C (Agilent Technologies)
- pokretna faza: vodena otopina Na₂Ca-EDTA, 50 mg L⁻¹, profiltrirana i odzračena u ultrazvučnoj kupelji
- protok mobilne faze: 0,5 ml min⁻¹
- temperatura kolone: 80 °C
- temperatura ćelije RI detektora: 40 °C
- vrijeme HPLC analize: 30 minuta

Udjel SDFS-a računa se prema sljedećoj jednadžbi [7]:

$$m(SDFS) = Rf \times m(IS) \times \frac{PA_{SDFS}}{PA_{IS}} \times \frac{100}{m} \quad [7]$$

gdje je:

m (SDFS) – masa vlakana topljivih u vodi i u 78 %-tnom etanolu (mg 100 g⁻¹)

Rf – faktor odgovora

m (IS) – masa internog standarda u 1 mL otopine pipetirane u uzorak (100 mg)

PA_SDFS – površina pikova za SDFS

PA_IS – površina pika internog standarda (D-sorbitol)

m – masa uzorka čiji je filtrat analiziran (g)

Slijepa proba:

Tijekom ispitivanja potrebno je napraviti slijepu probu u koju nije dodan uzorak pri istim uvjetima pri kojima su uzorci tretirani. Masa slijepa probe (mg) računa se prema jednadžbi [8]:

$$SP = \frac{BR_1 + BR_2}{2} - P_B - P_A \quad [8]$$

gdje je:

SP – slijepa proba (mg)

BR₁ i BR₂ – masa ostatka dvaju paralelnih određivanja slijepa probe (mg)

P_B – masa proteina određena u ostatku slijepa probe (mg)

P_A – masa pepela određena u ostatku slijepa probe (mg)

3.3. ODREĐIVANJE UDJELA PROTEINA

Uređaji i pribor:

- blok za spaljivanje 1007 (Tecator)
- uređaj za destilaciju (Kjeltec™8100, Tecator™Line)
- Erlenmeyerove tikvice, 250 mL
- bireta
- dispnzeta za koncentriranu H₂SO₄, 12 mL
- dispnzeta za bornu kiselinu, 25 mL
- kivete za Kjeltec sustav, 500 mL

Reagensi:

- H₂SO₄, koncentrirana
- natrijev hidroksid, 0,01 mol L⁻¹

- borna kiselina, 40 g L⁻¹
 - o priprema: iz borne kiseline, 99 – 100 % (Gram-mol) uz dodatak 12,5 mg L⁻¹ indikatora bromkrezol-zeleno i 8,75 mg L⁻¹ indikatora metilno crvenilo
- katalizator: Kjeldahl tablete s bakrom, 5 g/tableta (MerckKGaA)
- klorovodična kiselina, 0,01 mol L⁻¹

Princip određivanja:

Udjel proteina određen je metodom po Kjeldahlu. Organske tvari iz uzorka razore se zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom i katalizatorom (Kjeldahl tableta) uz oslobađanje proteinskog i neproteinskog dušika (osim dušika vezanog uz nitrata i nitrite) koji zaostaje u obliku amonijevih soli (amonijev sulfat).

Postupak:

Uzorak se nakon sušenja na 105 °C i hlađenja izvaže te se iz lončića prenese u kivetu od 500 mL. U kivetu se doda jedna Kjeldahl tableta i 12 mL koncentrirane sumporne kiseline, sadržaj kivete se lagano promiješa kako bi se cijeli uzorak navlažio kiselinom. Kivete se postave u blok za spaljivanje. Proces mineralizacije, odnosno spaljivanja provodi se sve dok tekućina u kivetama ne poprimi bistru, plavo-zelenu boju, a nakon spaljivanja kivete se uklanjaju iz bloka za spaljivanje te se hlade do sobne temperature. Nakon hlađenja, provodi se destilacija u Kjeltec uređaju. Kiveta se postavi na odgovarajuće mjesto u uređaju, Erlenmeyerova tikvica, u koju je prethodno dodano 25 mL borne kiseline, postavi se na postolje tako da je u nju uronjena destilacijska cjevčica. Pri destilaciji u Kjeltec uređaju, u kivetu se dodaje 80 mL destilirane vode i 50 mL NaOH te započinje destilacija. Nakon završene destilacije, provodi se titracija s 0,1 N HCl do promjene boje u ružičastu, a to označava kraj titracije. Utrošeni volumen klorovodične kiseline koristi se za izračun udjela proteina. Paralelno se provodi postupak određivanja slijepa probe, koja sadrži sve osim uzorka.

Udjel dušika i proteina izračunava se prema sljedećim jednadžbama [9,10]:

$$\text{Udjel dušika (\%)} = \frac{(a - b) \times N_{kis} \times f_{kis} \times 1,4007}{m(\text{uzorka})} \quad [9]$$

$$\text{Udjel proteina (\%)} = \%N * 6,25 \quad [10]$$

gdje je:

a – volumen HCl utrošen za titraciju uzorka (mL),

b – volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

N kis. – molaritet kiseline (0,1N HCl)

f kis – faktor kiseline (1)

(Vahčić i sur., 2008)

3.4. ODREĐIVANJE PEPELA

Posuđe i uređaji:

- mufolna peć, KR170,W. C. HERAEUS HANAU
- eksikator
- analitička vaga, ALS220-4N, Kern
- sušionik, ST-01/02, Instrumentaria

Princip određivanja:

Uzorak se mineralizira u mufolnoj peći pri određenoj temperaturi do postizanja pepela konstantne mase.

Postupak:

Nakon sušenja na 105 °C i hlađenja u eksikatoru, lončić s uzorkom izvaže se te se stavi u mufolnu peć na spaljivanje na 525 °C. Po završetku spaljivanja lončić s uzorkom hladi se u eksikatoru i važe kad postigne sobnu temperaturu.

Udjel pepela računa se prema jednadžbi [11]:

$$\text{Udjel pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [11]$$

gdje je:

m_1 – masa uzorka nakon sušenja (g)

m_2 – masa lončića s celitom (g)

m_3 – masa lončića s celitom i pepelom

(Vahčić i sur., 2008)

3.5. ODREĐIVANJE UDJELA VODE / SUHE TVARI POSTUPKOM SUŠENJA

Posude i uređaji:

- aluminijska posudica
- eksikator
- analitička vaga, ALS220-4N, Kern
- sušionik, ST-01/02, Instrumentaria

Princip određivanja:

Udjel vode određuje se indirektno, pri čemu se mjeri ostatak koji zaostaje nakon sušenja, a iz razlike u masi prije i nakon sušenja uzorka izračuna se udjel vode.

Postupak određivanja:

Izvaže se $2 \pm 0,0001$ g uzorka u prethodno osušenu (pri $105\text{ }^{\circ}\text{C}$), ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem. Nepokrivena posudica s uzorkom i poklopac se suše u sušioniku na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase. Po završetku sušenja, aluminijska posudica s uzorkom hladi se u eksikatoru na sobnu temperaturu i zatim važe. Iz razlike u masi prije i nakon sušenja izračuna se udjel vode. Ostatak uzorka predstavlja suhu tvar, a gubitak u masi udjel vode u uzorku.

Udjel vode računa se prema jednadžbi [12]:

$$\text{udjel vode (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [12]$$

gdje je:

m_1 – masa prazne aluminijske posudice (g)

m_2 – masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

(Vahčić i sur., 2008)

3.6. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE

Uređaji i pribor:

- centrifuga, Rotina 35 (Hetich)
- sušionik, ST-01/02, Instrumentaria

- analitička vaga, ALS220-4N, Kern
- plastične Falcon epruvete (50 mL)
- stakleni sinter lončić G4 (Boral)
- odsisna boca
- eksikator

Princip određivanja:

Kapacitet zadržavanja vode definiran je kao količina vode koja ostaje vezana za hidrirana vlakna nakon primjene vanjske sile poput tlaka ili centrifugiranja.

Postupak određivanja:

Izvaže se $1 \pm 0,0001$ g uzorka u Falcon epruvetu od 50 mL, doda se 30 mL vode i ostavi 18 h kako bi se uzorak hidrirao. Nakon 18 h uzorak se centrifugira 20 minuta na 3000 okretaja. Supernatant se nakon centrifugiranja uklanja vakuumskom filtracijom kroz stakleni sinter lončić. Lončić s hidriranim ostatkom se važe, a potom suši na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 2 h, te se ponovno važe nakon hlađenja.

Kapacitet zadržavanja vode računa se prema formuli [13]:

$$WRC (g g^{-1}) = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad [13]$$

gdje je:

WRC – kapacitet zadržavanja vode ($g g^{-1}$)

m_1 – masa ostatka nakon sušenja (g)

m_2 – masa ostatka nakon centrifugiranja (g)

(Raghavendra i sur., 2004)

3.7. Statistička obrada

Rezultati analiza obrađeni su pomoću jednosmjerne i faktorske analize varijance, uz *post hoc* Tukey test. Statistička analiza provedena je pomoću programa *Statistica 8* (Stat Soft Inc., SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju bit će prikazani dobiveni rezultati udjela IDF-a, SDFP-a, SDFS-a kao i dobiveni rezultati udjela topljivih vlakana (SDF) u analiziranim uzorcima heljdinih ljusaka izraženi na udjel ukupnih vlakana i izraženi na suhu tvar uzorka. Raspraviti će se kako različiti uvjeti kriomljevenja, odnosno kriomljevenje ljusaka heljde tijekom 8 minuta bez prosijavanja i kriomljevenje ljusaka heljde u intervalima od 8 minuta do postizanja veličine čestica < 56 μm te konačna veličina čestica utječu na udjel topljivih i netopljivih vlakana. Raspraviti će se o uvjetima enzimskog tretmana i o utjecaju interakcije različite veličine čestica uzoraka ljusaka heljde, vremena tretmana i udjela enzima na udjel topljivih i netopljivih vlakana.

Također prikazat će se dobiveni rezultati kapaciteta zadržavanja vode u analiziranim uzorcima heljdinih ljusaka.

4.1. UTJECAJ UZORKA, VREMENA TRETMANA, UDJELA ENZIMA, INTERAKCIJE NA UDJEL NETOPLJIVIH I TOPLJIVIH VLAKANA

U Tablici 3 prikazani su udjeli IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na suhu tvar uzorka.

Tablica 3. Udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na suhu tvar (ST) uzorka

Uzorak	IDF (% ST)	SDFP (% ST)	SDFS (% ST)	SDF (% ST)
8'KM 0	84,71 ± 0,09	1,47 ± 0,05	0,028 ± 0,008	1,49 ± 0,05
8'KM 1 h E 0,1 %	83,67 ± 0,36	1,37 ± 0,01	0,070 ± 0,005	1,44 ± 0,02
8'KM 1 h E 1 %	81,15 ± 0,27	1,20 ± 0,11	0,131 ± 0,007	1,33 ± 0,11
8'KM 4 h E 0,1 %	83,65 ± 0,46	1,41 ± 0,11	0,074 ± 0,010	1,49 ± 0,12
8'KM 4 h E 1 %	80,51 ± 0,08	1,34 ± 0,07	0,143 ± 0,003	1,48 ± 0,07
8'KM 8 h E 0,1 %	82,43 ± 0,28	1,39 ± 0,11	0,070 ± 0,003	1,46 ± 0,11
8'KM 8 h E 1 %	81,11 ± 0,33	1,66 ± 0,02	0,147 ± 0,007	1,80 ± 0,03
< 56 μm 0	83,85 ± 0,45	1,50 ± 0,10	0,035 ± 0,001	1,54 ± 0,10
< 56 μm 1 h E 0,1 %	83,79 ± 0,38	1,70 ± 0,01	0,077 ± 0,005	1,78 ± 0,01
< 56 μm 1 h E 1 %	81,70 ± 0,46	1,76 ± 0,03	0,154 ± 0,010	1,91 ± 0,05
< 56 μm 4 h E 0,1 %	83,23 ± 0,45	1,72 ± 0,03	0,092 ± 0,013	1,81 ± 0,05
< 56 μm 4 h E 1 %	80,18 ± 0,32	1,75 ± 0,02	0,155 ± 0,013	1,91 ± 0,04
< 56 μm 8 h E 0,1 %	83,54 ± 0,37	1,45 ± 0,09	0,087 ± 0,006	1,54 ± 0,10
< 56 μm 8 h E 1 %	81,85 ± 0,57	1,31 ± 0,05	0,169 ± 0,003	1,48 ± 0,05
< 56 μm 1 h E 1 % celulaza	82,33 ± 0,62	1,55 ± 0,02	0,188 ± 0,015	1,74 ± 0,35
< 56 μm 1 h E 1 % hemicelulaza	83,96 ± 0,15	1,45 ± 0,21	0,075 ± 0,007	1,52 ± 0,20

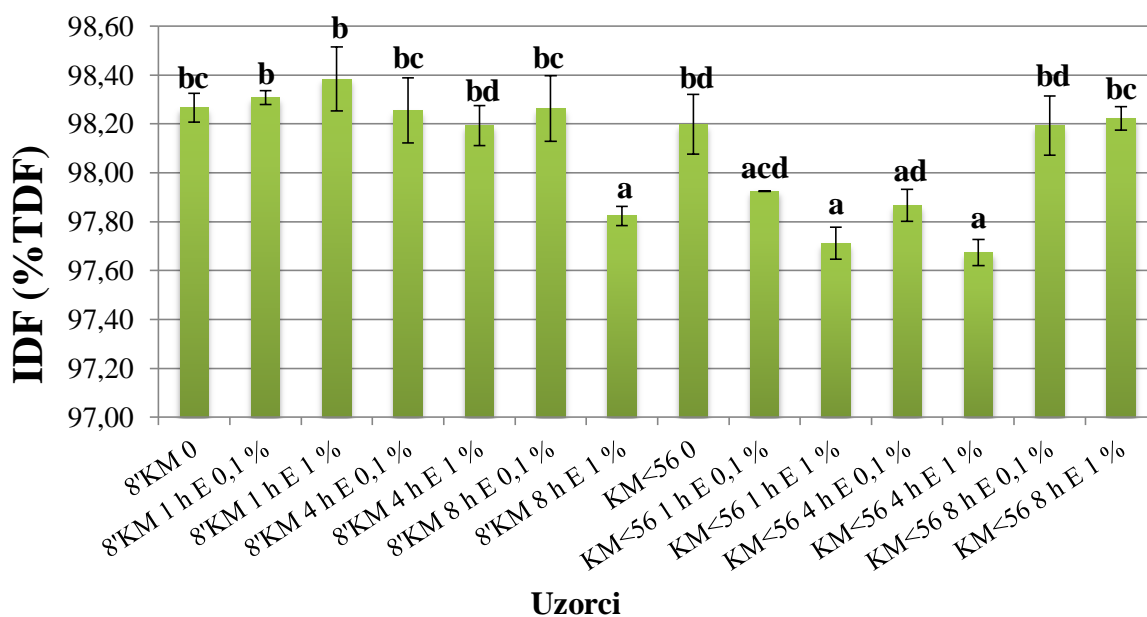
Udjel netopljivih vlakana u enzimski netretiranim uzorcima kretao se u rasponu od 83,85 % do 84,71 % suhe tvari uzorka. U enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde udjel netopljivih vlakana kretao se u rasponu od 80,18 % do 83,79 % suhe tvari uzorka.

U enzimski netretiranim uzorcima udjel SDFP-a kretao se u rasponu od 1,47 % do 1,50 % suhe tvari uzorka, a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde udjel SDFP-a vlakana kretao se u rasponu od 1,20 % do 1,76 % suhe tvari uzorka.

U enzimski netretiranim uzorcima udjel SDFS-a kretao se u rasponu od 0,028 % do 0,035 % suhe tvari uzorka. Udjel SDFS-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde kretao se u rasponu od 0,070 % do 0,169 % suhe tvari uzorka.

Udjel topljivih vlakana u enzimski netretiranim uzorcima kretao se u rasponu od 1,49 % do 1,54 % suhe tvari uzorka, a udjel topljivih vlakana u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde kretao se u rasponu od 1,33 % do 1,91 % suhe tvari uzorka.

Slika 3 prikazuje udjel IDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražene na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



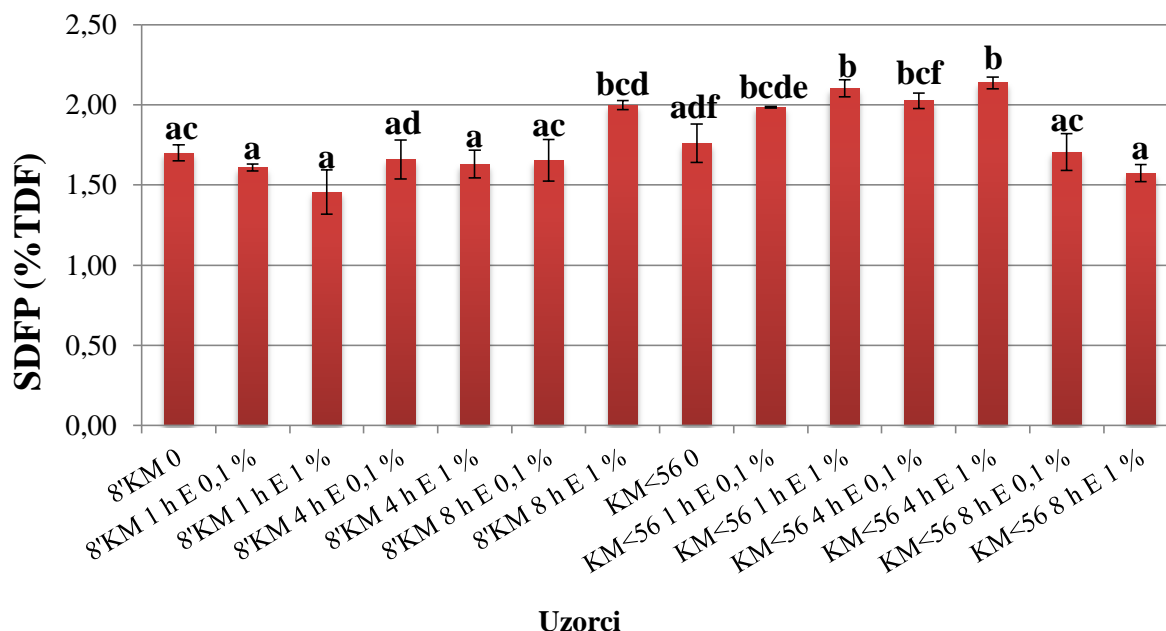
Slika 3. Udjel netopljivih vlakana (IDF) u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF)

Na Slici 3 vidljivo je da u enzimski netretiranim uzorcima ljusaka heljde, 8'KM 0 i $< 56 \mu\text{m}$ 0 nije bilo statistički značajne razlike u udjelu IDF-a izraženom na udjel ukupnih vlakana. Uzorak 8'KM s dodatkom 1 % enzima i provedenim enzimskim tretmanom 8 h te uzorci $< 56 \mu\text{m}$ s dodatkom 1 % enzima i provedenim enzimskim tretmanom u trajanju 1 h i 4 h imali su manji udjel IDF-a izražen na udjel ukupnih vlakana nego u enzimski netretiranim uzorcima heljdinih ljusaka.

U uzorku 8'KM s dodatkom 1 % enzima i enzimskim tretmanom 8 h postignut je udjel IDF-a 97,82 % TDF, a to predstavlja smanjenje udjela za 0,46 % u odnosu na enzimski netretiran uzorak 8'KM 0 (98,27 % TDF). U enzimski netretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 0 udjel netopljivih vlakana iznosio je 98,20 % TDF, a statistički značajno smanjenje udjela IDF-a postignuto je u enzimski tretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 1 h E 1 % (97,71 % TDF) za 0,50 %. U enzimski tretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 4 h E 1 % udjel IDF-a smanjio se na 97,67 % TDF (smanjenje udjela za 0,54 %) u odnosu na udjel IDF-a u enzimski netretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 0.

U odnosu na različito vrijeme tretmana, u enzimski tretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 8 h E 1 % postignut udjel IDF-a 98,22 % TDF, bio je veći za 0,52 % od udjela IDF-a u enzimski tretiranom uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 1 h E 1 %. U uzorku $< 56 \mu\text{m}$ s dodatkom 1 % enzima i enzimskim tretmanom 4 h postignut udjel IDF-a 97,67 % TDF bio je manji za 0,56 % u odnosu na udjel IDF-a u uzorku $< 56 \mu\text{m}$ s dodatkom 1 % enzima i enzimskim tretmanom 8 h.

Slika 4 prikazuje udjel SDFP-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražene na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



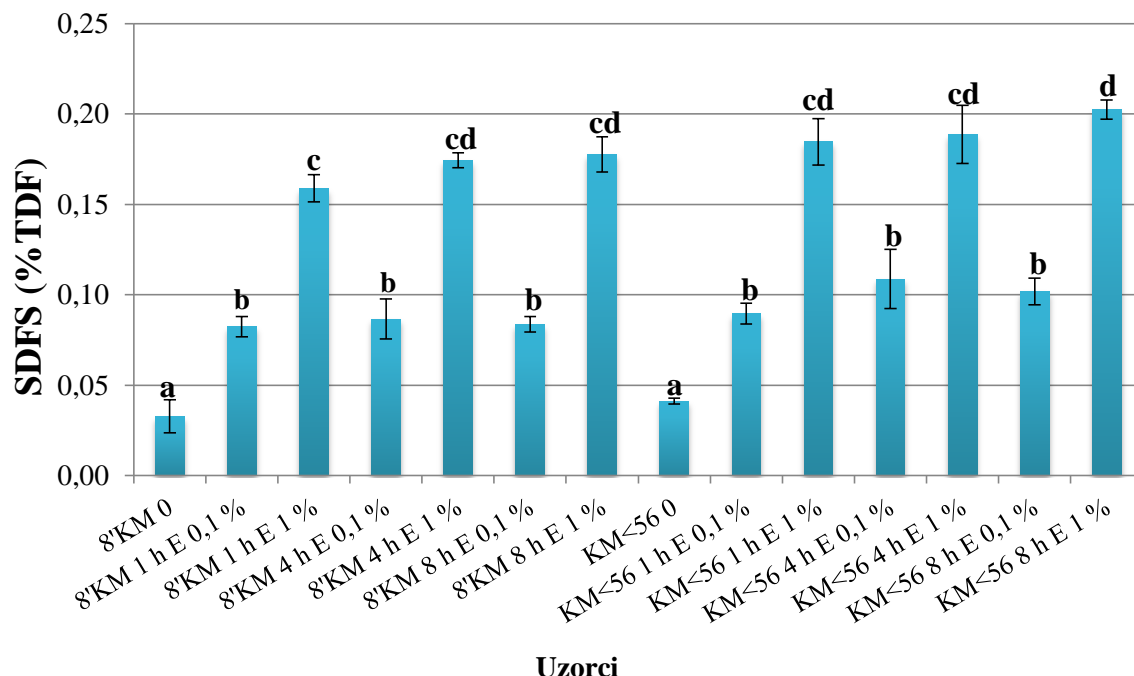
Slika 4. Udjel vlakana topljivih u vodi, a netopljivih u 78 %-tnom etanolu (SDFP) u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF)

U enzimskim netretiranim uzorcima ljusaka heljde, 8'KM 0 i < 56 μ m 0 nije bilo statistički značajne razlike u udjelu SDFP-a izraženog na udjel ukupnih vlakana. Uzorci < 56 μ m s dodatkom 1 % enzima i provedenog enzimskog tretmana u trajanju 1 h i 4 h imali su znatno veći udjel SDFP-a izražen na udjel ukupnih vlakana nego u enzimski netretiranim uzorcima heljdinih ljuska. U enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 1 h E 1 % (2,10 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μ m 0 (1,76 % TDF) postignuto je povećanje SDFP-a za 19,32 %, a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 4 h E 1 % (2,14 % TDF) postignuto je povećanje za 21,59 % u odnosu na enzimski netretirani uzorak < 56 μ m 0.

Uspoređujući enzimski tretirane uzorke s dodatkom 1 % enzima u odnosu na različito vrijeme tretmana, postojale su značajne razlike u udjelu SDFP-a. Udjel SDFP-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % bio je veći za 32,93 % od udjela SDFP-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 1 % (1,46 % TDF), te za 22,70 % od udjela SDFP-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 1 % (1,63 % TDF).

U odnosu na različit udjel enzima u enzimski tretiranim uzorcima 8'KM 8 h E 1 % i 8'KM 8 h E 0,1 %, udjel SDFP-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % je za 21,21 % veći od udjela SDFP-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 0,1 % (1,65 % TDF).

Slika 5 prikazuje udjel SDFS-a u enzimski tretiranim uzorcima ljustaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



Slika 5. Udjel vlakana topljivih u vodi i u 78 %-tnom etanolu (SDFS) u enzimski tretiranim uzorcima ljustaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF)

U enzimskim netretiranim uzorcima ljustaka heljde, 8'KM 0 i < 56 μ m 0 nije bilo statistički značajne razlike u udjelu SDFS-a izraženom na udjel ukupnih vlakana. Na Slici 5. vidljivo je da je u enzimskim netretiranim uzorcima zabilježen i najmanji udjel SDFS-a u odnosu na enzimski tretirane uzorke ljustaka heljde te da svi enzimski tretirani uzorci imaju znatno veći udjel SDFS-a.

U odnosu na enzimski netretiran uzorak 8'KM 0, u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 5,3 puta (s 0,03 na 0,16 % TDF). Udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 1 % povećao se 5,7 puta (s 0,03 % na 0,17 % TDF), a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % udjel SDFS-a povećao se 6 puta (s 0,03 % na 0,18 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak 8'KM 0. U enzimski tretiranim

uzorcima heljdinih ljusaka samljeveni na kriomlinu 8 minuta s dodatkom enzima 0,1 % udjel SDFS-a statistički značajno se povećao u odnosu na enzimski netretiran uzorak 8'KM 0. Udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 0,1 % povećao se 2,7 puta (s 0,03 % na 0,08 % TDF) u odnosu na udjel SDFS-a u enzimski netretiranom uzorku 8'KM 0. U enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 0,1 % udjel SDFS-a povećao se 3 puta (s 0,03 % na 0,09 % TDF), a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 0,1 % udjel SDFS-a povećao se 2,7 puta (s 0,03 % na 0,08 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak 8'KM 0.

U enzimski tretiranim uzorcima koji su tretirani različitim udjelom enzima istovremeno, postignut udjel SDFS-a veći je u uzorcima s dodatkom 1 % enzima. Udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 1 % (0,16 % TDF) veći je 2 puta u odnosu na postignut udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 0,1 % (0,08 % TDF). U enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 1 % (0,17 % TDF) postignut udjel SDFS-a veći je 1,8 puta u odnosu na udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 0,1 % (0,09 % TDF). Postignut udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % (0,18 % TDF) veći je 2,3 puta u odnosu na postignut udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 0,1 % (0,08 % TDF).

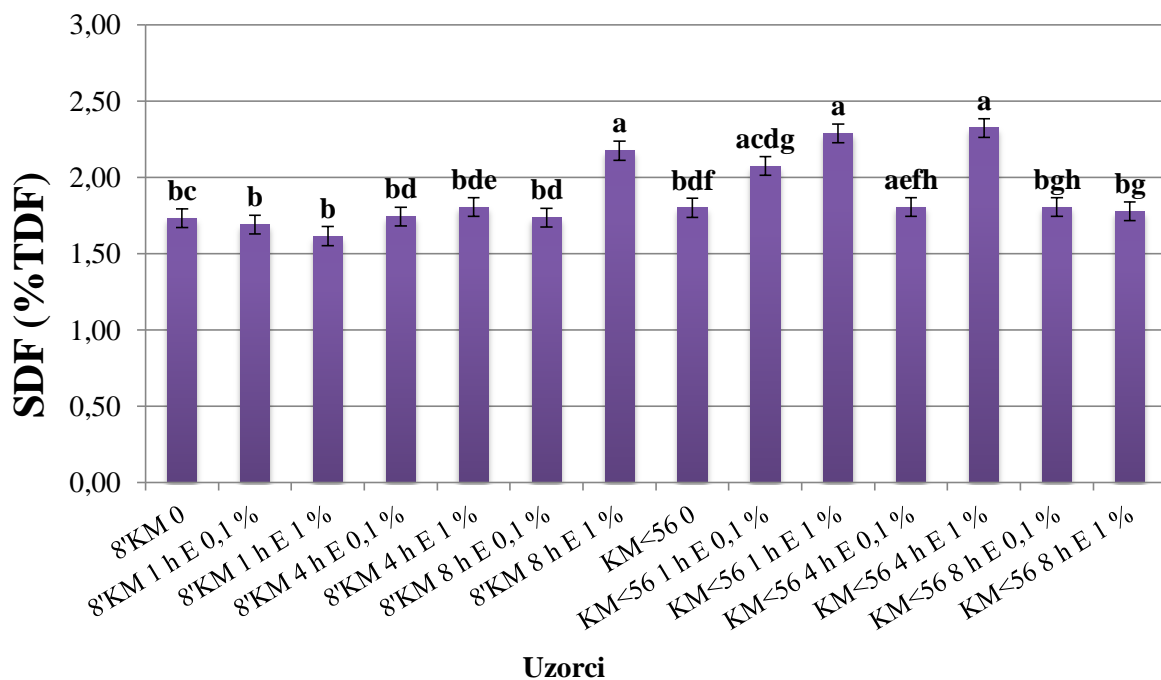
U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 1 h E 1 %, postignuto je povećanje udjela SDFS-a 4,5 puta (s 0,04 % na 0,18 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0. U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 4 h E 1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 4,8 puta (s 0,04 % na 0,19 % TDF), a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 8 h E 1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 5 puta (s 0,04 % na 0,20 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0.

U odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0, u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 1 h E 0,1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 2,3 puta (s 0,04 na 0,09 % TDF). U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 4 h E 0,1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 2,8 puta (s 0,04 na 0,11 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0. U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 8 h E 0,1 % postignuto je povećanje udjela SDFS-a 2,5 puta (s 0,04 na 0,10 % TDF) u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0.

Uspoređujući udjel SDFS-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde s veličinom čestica < 56 μm u odnosu na udjel enzima, uzorci s dodatkom 1 % enzima imali su veći udjel SDFS-a od uzoraka s dodatkom 0,1 % enzima. U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 1 h E 1 % (0,18 % TDF) postignut je 2 puta veći udjel SDFS-a u odnosu na udjel SDFS-a u enzimski

tretiranom uzorku < 56 μm 1 h E 0,1 % (0,09 % TDF). Udjel SDFS-a postignut u uzorku < 56 μm 4 h E 1 % (0,19 % TDF) za 1,7 puta bio je veći od udjela SDFS-a postignutog u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 4 h E 0,1 % (0,11 % TDF). U enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 8 h E 1 % (0,20 % TDF) postignut udjel SDFS-a bio je 2 puta veći u odnosu na udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 8 h E 0,1 % (0,10 % TDF).

Slika 6 prikazuje udjel SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



Slika 6. Udjel topljivih vlakana (SDF) u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF)

Na Slici 6 vidljivo je da su enzimski netretirani uzorci ljusaka heljde, 8'KM 0 i < 56 μm 0, imali slične udjele SDF-a izražene na udjel ukupnih vlakana. Uzorak 8'KM s dodatkom 1 % enzima i provedenim enzimskim tretmanom 8 h te uzorci < 56 μm s dodatkom 1 % enzima i provedenim enzimskim tretmanima u trajanju 1 h i 4 h imali su statistički značajno veći udjel SDF-a izražen na udjel ukupnih vlakana nego u netretiranim uzorcima heljдинih ljuska.

U enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % postignuto je povećanje udjela SDF-a za 26,01 % (s 1,73 % na 2,18 % TDF) u odnosu na udjel SDF-a u enzimski netretiranom uzorku 8'KM 0. U enzimski tretiranim uzorcima tretirani različitim udjelom enzima, postignut udjel SDF-a

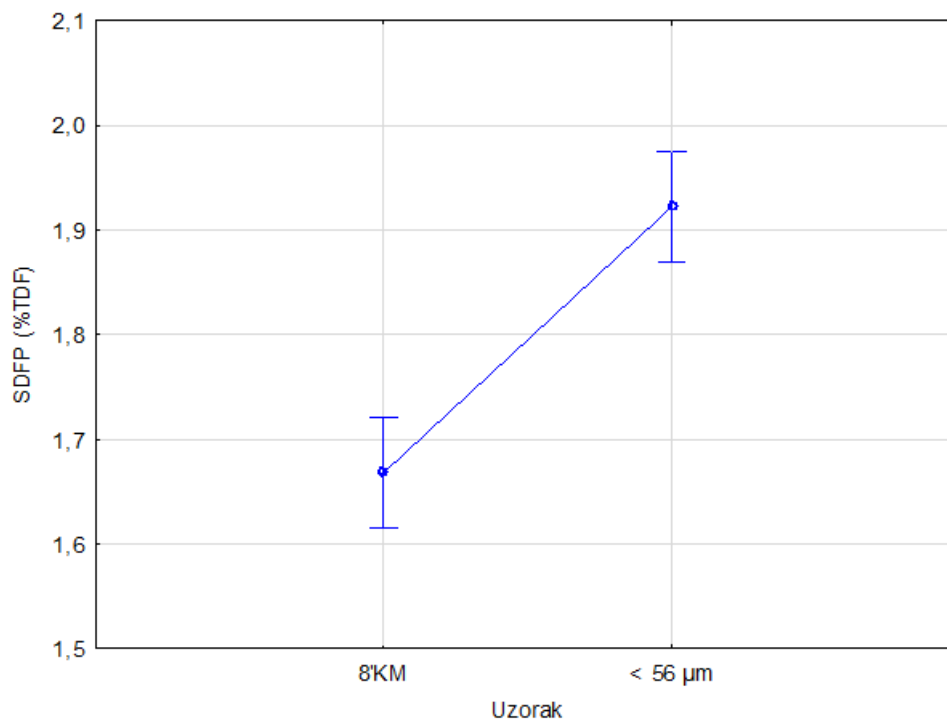
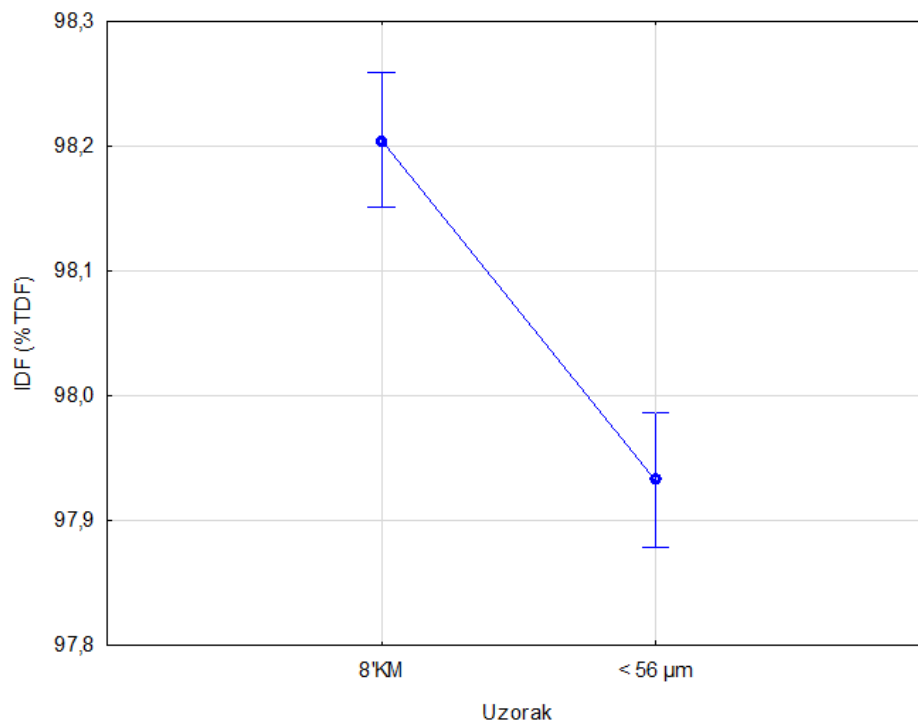
u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % bio je za 25,29 % veći od udjela SDF-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 0,1 % (1,74 % TDF).

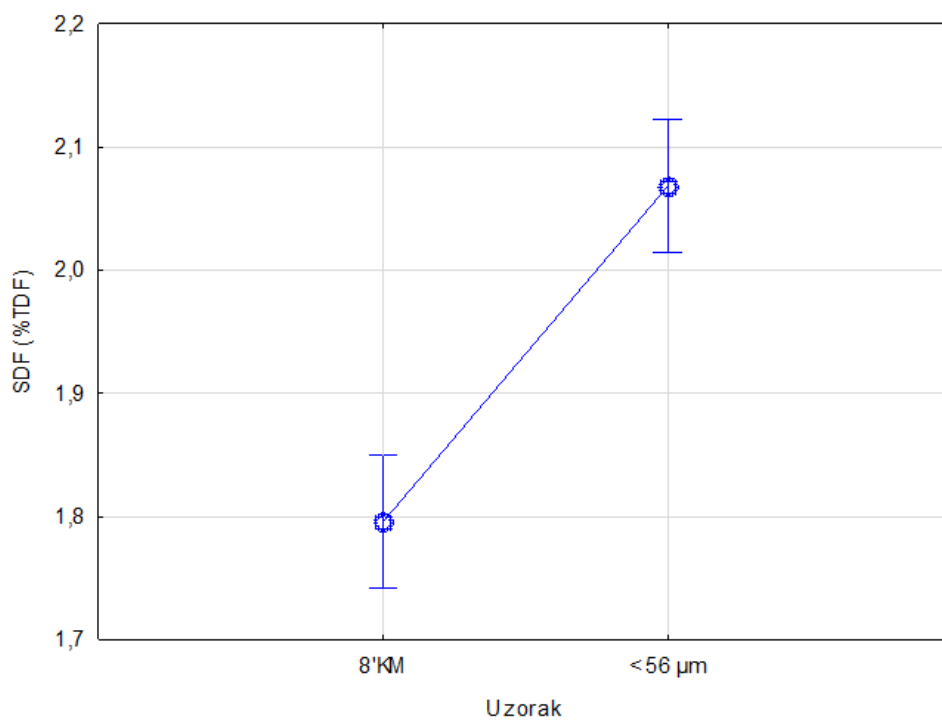
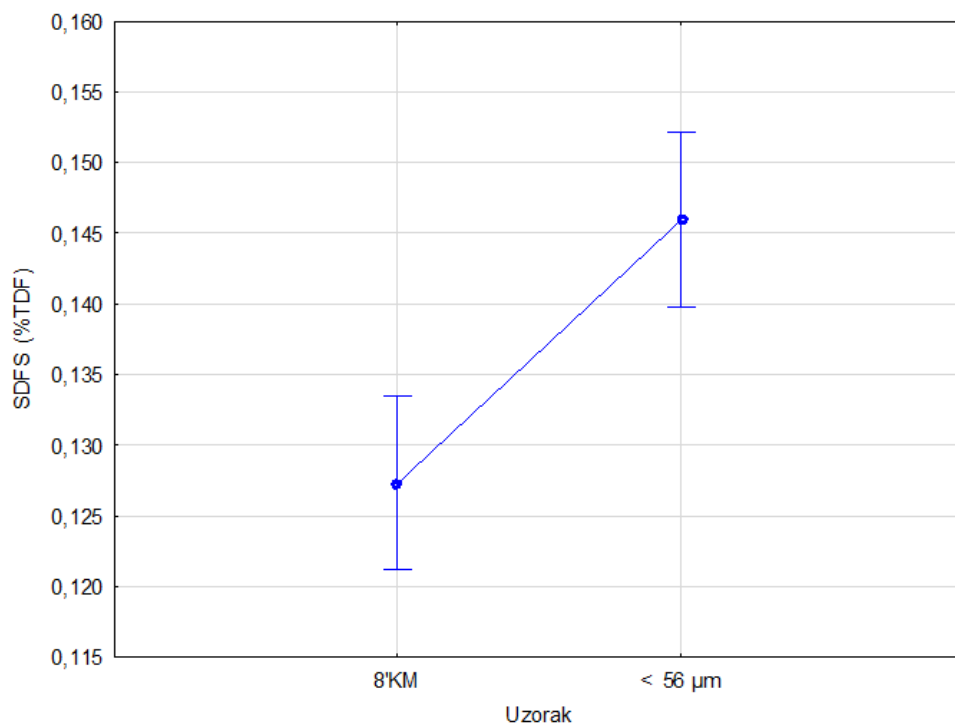
U odnosu na različito vrijeme tretmana, a s dodatkom 1 % enzima, udjel SDF-a u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 8 h E 1 % bio je veći za 34,57 % od udjela SDF-a postignutog u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 1 h E 1 % (1,62 % TDF), a za 20,44 % veći od udjela SDF-a postignutog u enzimski tretiranom uzorku 8'KM 4 h E 1 % (1,81 % TDF).

Udjel topljivih vlakana u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 4 h E 1 % povećao se za 29,44 % (s 1,80 % na 2,33 % TDF), a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 1 h E 1 % povećao se 27,22 % (s 1,80 % na 2,29 % TDF) u odnosu na udjel topljivih vlakana u enzimski netretiranom uzorku < 56 μ m 0. Između enzimski tretiranih uzoraka ljsaka heljde s veličinom čestica < 56 μ m postojale su statistički značajne razlike u odnosu na vrijeme tretmana. Postignut udjel SDF-a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 8 h E 1 % iznosio je 1,78 % TDF te je bio manji za 28,65 % u odnosu na udjel SDF-a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 1 h E 1%, a u odnosu na udjel SDF-a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μ m 4 h E 1 % bio je manji za 30,90 %.

Stedman i suradnici proveli su istraživanje kako mljevenje sjemena heljde na različite frakcije utječe na makronutritivni sastav i vlakna. U istraživanju su frakcije sjemena heljde bile podijeljene u dvije grupe. Frakcije mljevenja sjemena heljde proizvele su se mljevenjem netaknutog trokutastog ploda heljde (zrelo suho sjeme heljde) ili uklanjanjem ljsuke sa sjemena heljde udarcima, te mljevenjem sjemena bez ljsuke čime se dobila kaša. Rezultati istraživanja pokazali su da je postignut udjel ukupnih vlakana u heljdinim mekinjama dvostruko veći u odnosu na udjel ukupnih vlakana u heljdinoj kaši te 5 do 10 puta veći u odnosu na brašno. Također pokazao se utjecaj ljsuke na udjel vlakana, te uzorci heljde samljeveni s ljuskom imali su duplo veći udjel ukupnih vlakana u usporedbi sa samljevenim zrnom heljde bez ljsuke. Istraživanje je također pokazalo da na udjel vlakana utječe veličina čestica uzorka. U devet samljevenih frakcija postignut udjel SDF-a iznosio je više od 60 % udjela ukupnih vlakana (Stedman i sur., 2001).

Na Slici 7 prikazan je utjecaj različite veličine čestica uzoraka ljsaka heljde na udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljsaka heljde.

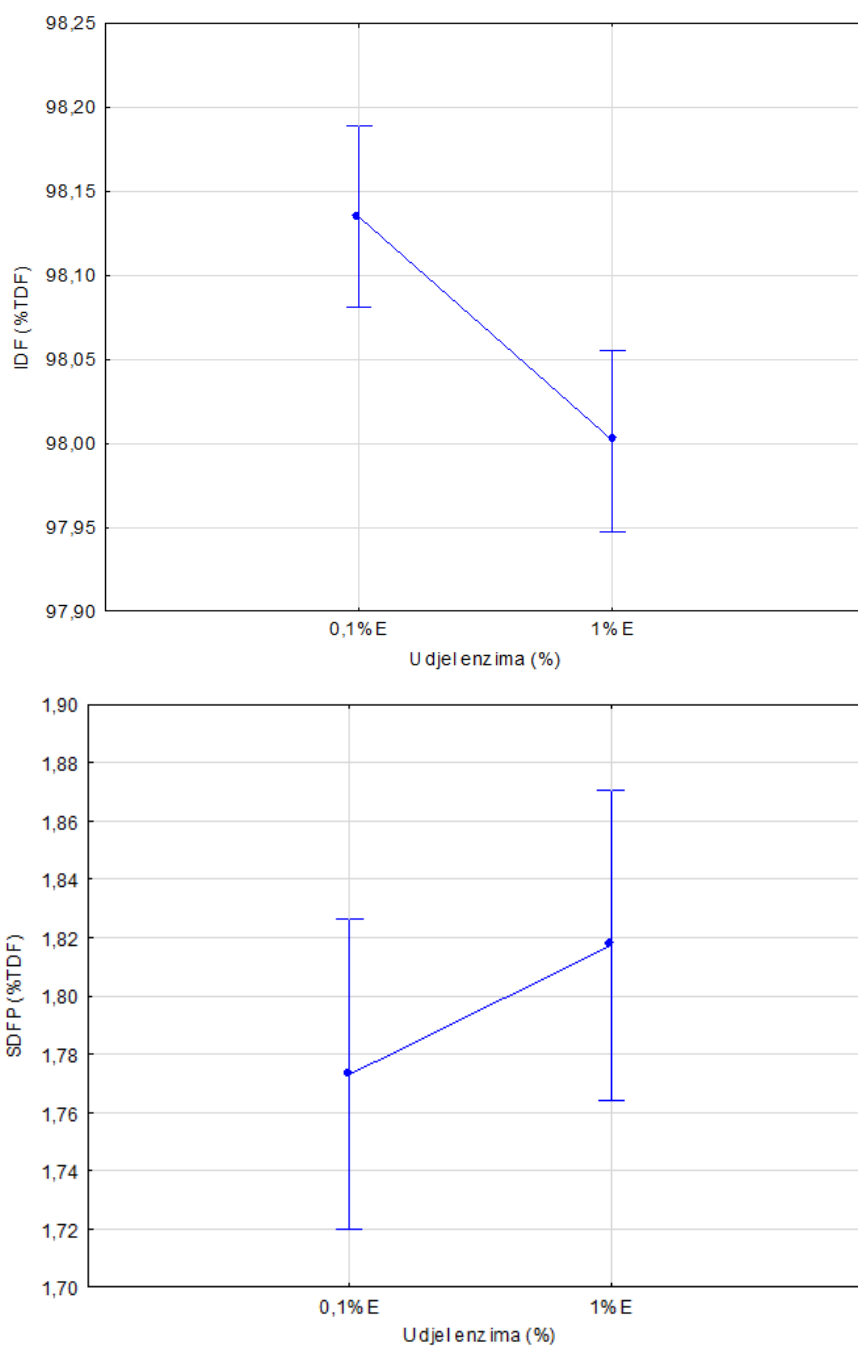


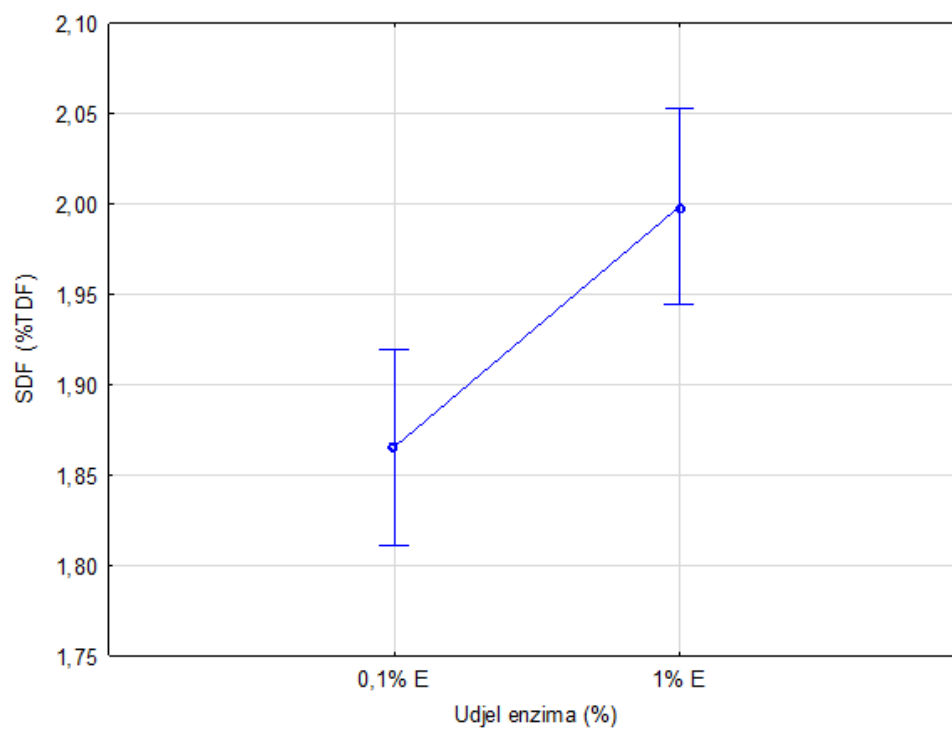
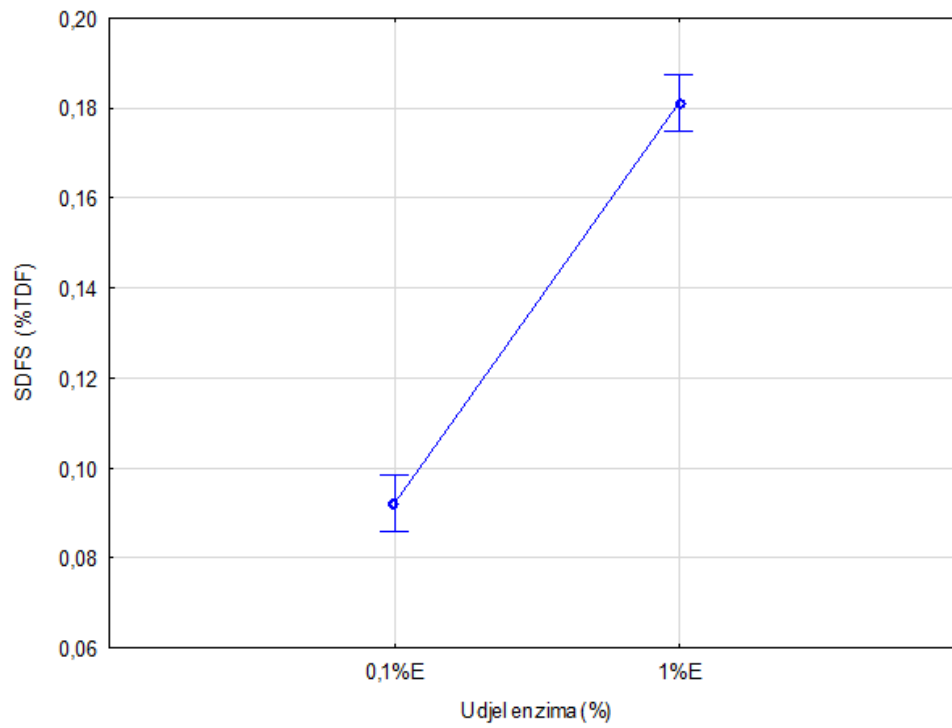


Slika 7. Utjecaj različite veličine čestica uzoraka ljusaka heljde na udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde

Promatrajući utjecaj različite veličine čestica uzoraka ljustaka heljde, vidljivo je da veličina čestica značajno utječe na udjel IDF-a, SDFP-a i SDFS-a, pri čemu je kod manje veličine čestica uzorka ($< 56 \mu\text{m}$) određen manji udjel IDF-a ($p < 0,001$) te veći udjel SDFP-a ($p < 0,001$), SDFS-a ($p = 0,001$) i SDF ($p < 0,001$).

Na Slici 8 prikazan je utjecaj udjela enzima na udjele IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljustaka heljde.

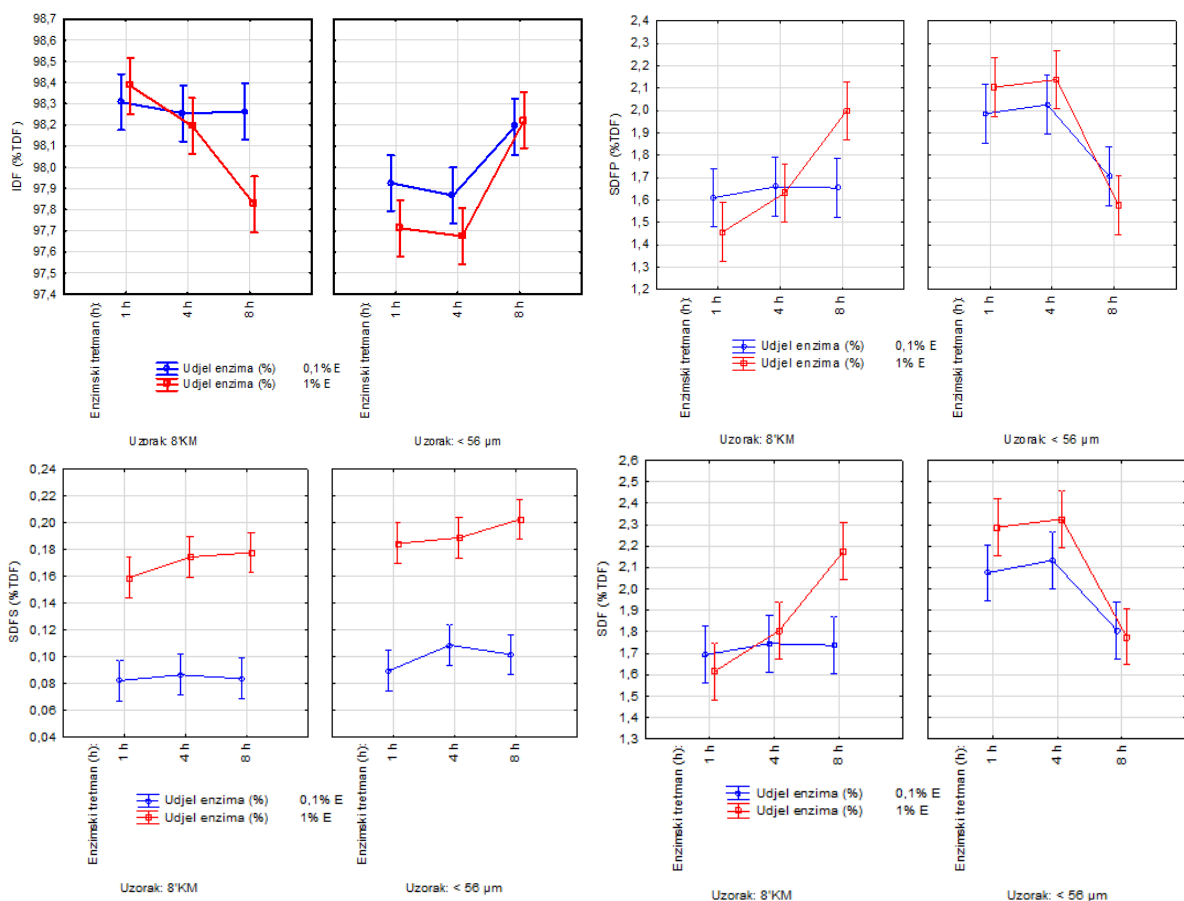




Slika 8. Utjecaj udjela enzima na udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde

Uzorcima su dodani enzimi, celulaza i hemicelulaza, u različitim udjelima (0,1 % ili 1 %) te se pokazalo da veći udjel enzima značajno smanjuje udjel IDF-a ($p = 0,003$), a značajno povećava udjel SDFS-a ($p < 0,001$), a za udjel SDFP-a ($p = 0,226$) nije utvrđen statistički značajan utjecaj udjela enzima. No promatrajući utjecaj udjela enzima na udjel topljivih vlakana, dodatak enzima 1 % značajno je povećao udjel SDF-a ($p = 0,003$).

Na slici 9 prikazana je interakcija različite veličine čestica uzoraka ljusaka heljde, vremena i udjela enzima na udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde.



Slika 9. Interakcija različite veličine čestica uzoraka ljusaka heljde, vremena i udjela enzima na udjel IDF-a, SDFP-a, SDFS-a i SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima ljusaka heljde

Promatrajući interakciju različite veličine čestica uzoraka ljusaka heljde, vremena enzimskog tretmana i udjela enzima, vidljivo je da je međusobna interakcija navedenih parametara značajno utjecala na udjel IDF-a i SDFP-a. U uzorku 8'KM s dodatkom 1 % enzima produljenjem enzimskog tretmana na 8 h udjel IDF-a značajno se smanjio, a udjel SDFP-a

vlakana značajno se povećao. Također u uzorcima < 56 μm s udjelom enzima 0,1 % i 1 %, produljenje enzimskog tretmana dovelo je do značajnog povećanja udjela IDF-a i značajnog smanjenja SDFP-a.

Promatrajući dobivene udjele IDF-a između uzoraka ljustica heljde s različitim veličinom čestica, u uzorcima 8'KM s udjelom enzima 0,1 % i 1 % tretiranim 1 h postignut je znatno veći udjel IDF-a od uzoraka < 56 μm s 0,1 % i 1 % enzima tretiranim 1 h i 4 h. Nadalje uzorci 8'KM s 0,1 % enzima tretirani 4 h i 8 h imaju veći udjel IDF-a od uzoraka < 56 μm s 0,1 % i 1 % enzima tretiranih 4 h i uzorka < 56 μm s 1 % enzima tretiranog 1 h.

Udjel SDFS-a u uzorku < 56 μm s dodatkom 1 % enzima značajno bio je veći nego u uzorku < 56 μm s manjim udjelom enzima, isti takav trend pojavio se i kod uzorka 8'KM za udjel SDFS-a.

Uspoređujući uzorke 8'KM i < 56 μm koji su podvrgnuti istom enzimskom tretmanu s istim udjelom enzima također je došlo do značajnih promjena u udjelu IDF-a i SDF-a. Uzorci < 56 μm s udjelom enzima 0,1 % i 1 %, podvrgnuti enzimskom tretmanu u trajanju od 1 h i 4 h imali su značajno manji udjel IDF-a od uzoraka 8'KM pri istim uvjetima. Udjel SDF-a bio je značajno veći u uzorcima < 56 μm s dodatkom 0,1 % i 1 % enzima koji su podvrgnuti enzimskom tretmanu u trajanju 1 h i 4 h usporedno s uzorkom 8 'KM pri istim uvjetima. Takva razlika u udjelima vlakana može se pripisati veličina čestica, s obzirom na to da se usitnjavanjem povećava površina uzorka koja postaje dostupnija za djelovanje enzima.

Nakon provedene međusobne usporedbe utjecaja svih parametara na udjel SDF-a u tretiranim uzorcima ljustica heljde i usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da veličina čestica uzorka i udjel enzima imaju značajan utjecaj na udjel topljivih vlakana, te su uzorci s manjom veličinom čestica (< 56 μm) tretirani s dodatkom većeg udjela enzima (1 %) imali veći udjel SDF-a.

Budući da je cilj istraživanja bio ispitati utječe li usitnjavanje i enzimski tretman ljustica heljde na povećanje udjela topljivih vlakana, definirani su sljedeći optimalni uvjeti:

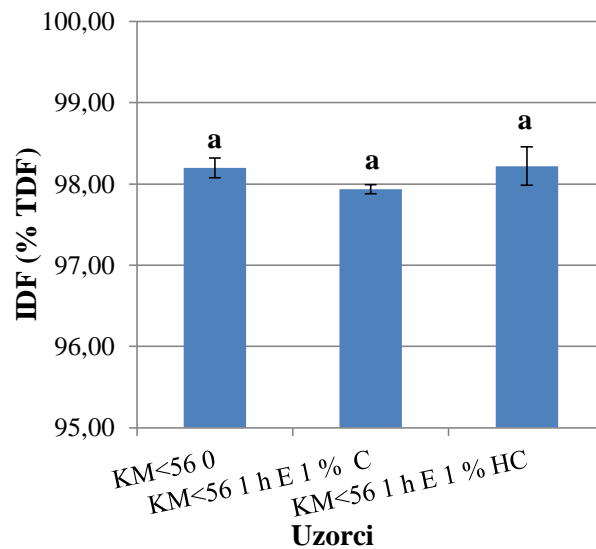
- usitnjavanje uzorka na veličinu čestica < 56 μm ,
- tretman tijekom 1 sata, s dodatkom 1 % celulaze i 1 % hemicelulaze.

U uzorku < 56 μm 1 h E 1 %, a to odgovara navedenim optimalnim uvjetima, postignuto je povećanje udjela SDFP-a s 1,50 % na 1,76 % suhe tvari uzorka, odnosno povećanje za 17,33

%, povećanje udjela SDFS-a 4,4 puta, (s 0,035 % na 0,154 % suhe tvari uzorka), te je postignuto povećanje udjela SDF-a s 1,54 % na 1,91 % suhe tvari uzorka, odnosno povećanje za 24,03 % (Tablica 3).

Pri definiranim optimalnim uvjetima bio je proveden tretman pojedinačnim enzimima kako bi se utvrdio pojedinačni utjecaj enzima na udjel netopljivih i topljivih vlakana.

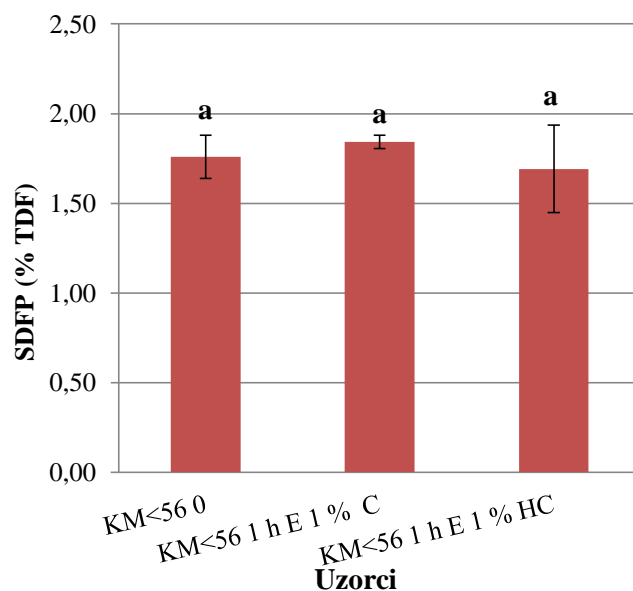
Na Slici 10 prikazan je udjel IDF-a u uzorku < 56 μ m koji nije tretiran enzimima, uzorku < 56 μ m tretiranom s dodatkom 1 % celulaze i uzorku < 56 μ m tretiranom s dodatkom 1 % hemicelulaze, izražen na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



Slika 10. Udjel IDF-a u uzorcima ljusaka heljde tretiranim zasebnim enzimima izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF); C – celulaza, HC – hemicelulaza

Enzimski tretman ljusaka heljde < 56 μ m zasebnim enzimima pri optimalnim uvjetima nije imao značajan utjecaj na udjel IDF-a izražen na udjel ukupnih vlakana.

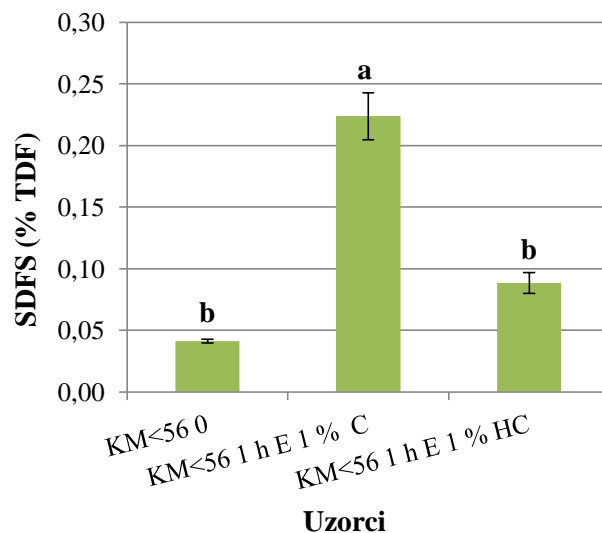
Na Slici 11 prikazan je udjel SDFP-a u uzorku < 56 μ m koji nije tretiran enzimima, uzorku < 56 μ m tretiranom s dodatkom 1 % celulaze i uzorku < 56 μ m tretiranom s dodatkom 1 % hemicelulaze, izražen na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



Slika 11. Udjel SDFP-a u uzorcima ljusaka heljde tretiranim zasebnim enzimima izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF); C – celulaza, HC – hemicelulaza

Na udjel SDFP-a, tretman ljusaka heljde < 56 μm , pri optimalnim uvjetima nije imao značajan utjecaj.

Na slici 12 prikazan je udjel SDFS-a u uzorku < 56 μm koji nije tretiran enzimima, uzorku < 56 μm tretiranom s dodatkom 1 % celulaze i uzorku < 56 μm tretiranom s dodatkom 1 % hemicelulaze, izražen na udjel ukupnih vlakana. Različitim slovima označene su statistički značajno različite vrijednosti ($p > 0,05$).



Slika 12. Udjel SDFS-a u uzorcima ljusaka heljde tretiranim zasebnim enzimima izražen na udjel ukupnih vlakana (TDF); C – celulaza, HC – hemicelulaza

Do značajne razlike u udjelu SDFS-a došlo je prilikom tretmana ljusaka heljde < 56 μm , zasebnim enzimima pri optimalnim uvjetima. Dodatak hemicelulaze u uzorak ljusaka heljde nije imao značajan utjecaj na udjel SDFS-a usporedno s enzimski netretiranim uzorkom. Usporedno s enzimski netretiranim uzorkom, značajno povećanje udjela SDFS-a postignuto je u uzorku s dodatkom 1 % celulaze, zabilježeno je povećanje udjela 5,4 puta (s 0,035 % na 0,188 % suhe tvari uzorka). Tretman celulazom imao je značajniji utjecaj na povećanje udjela topljivih vlakana u tretiranim uzorcima. Dodatak celulaze utjecao je na povećanje SDF-a za 12,99 % u odnosu na enzimski netretiran uzorak < 56 μm 0 (s 1,54 % na 1,74 % suhe tvari uzorka) (Tablica 3).

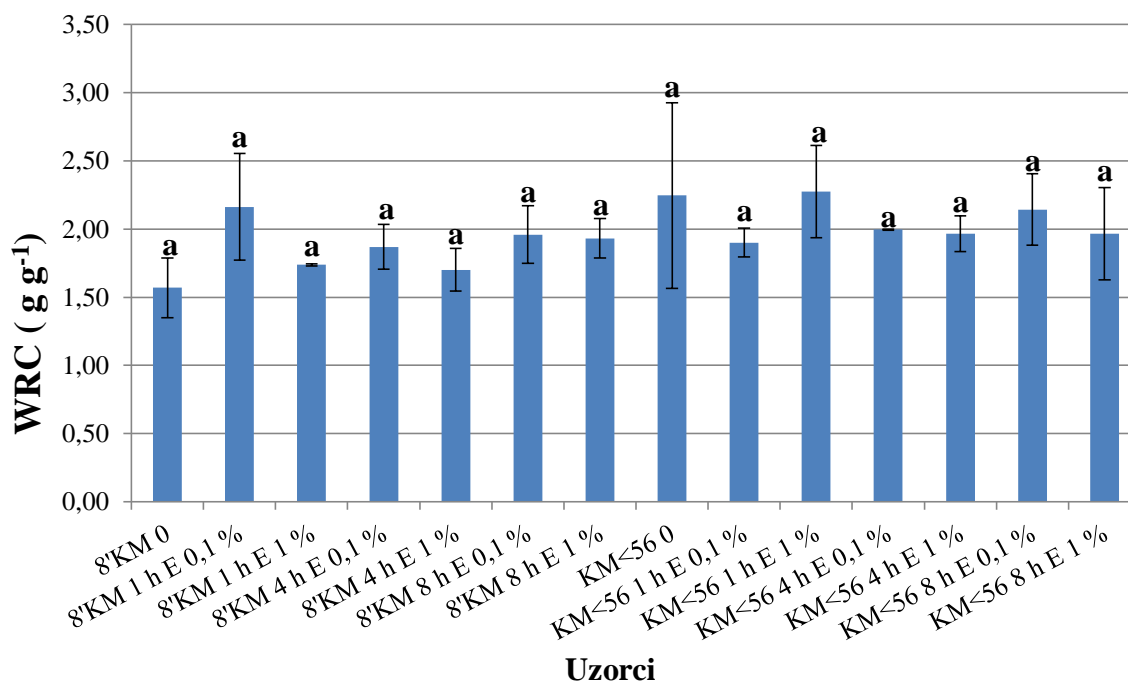
U enzimski tretiranim uzorcima < 56 μm 1 h E 1 % i < 56 μm 4 h E 1 % postignut je najveći udjel SDF-a i udjel SDFS-a u odnosu na enzimski netretirani uzorak < 56 μm 0. Postignut udjel SDFS-a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 1 h E 1 % (0,154 % ST) bio je za 22 % manji u odnosu na postignuti udjel SDFS-a u uzorku < 56 μm s dodatkom 1 % celulaze, a u enzimski tretiranom uzorku < 56 μm 4 h E 1 % (0,155 % ST) postignut udjel SDFS-a bio je manji za 21, 29 % od udjela SDFS-a u uzorku < 56 μm s dodatkom 1 % celulaze i enzimskog tretmana u trajanju 1. Usporedbom postignutog udjela SDF-a u enzimski tretiranim uzorcima < 56 μm 1 h E 1 % i < 56 μm 4 h E 1 % s uzorkom < 56 μm s dodatkom 1 % celulaze i enzimskog tretmana u trajanju 1 h nije bilo značajne razlike u udjelu SDF-a, kao ni u postignutom udjelu SDFP-a.

Zhu i suradnici (2014) u svom istraživanju o utjecaju mikronizacijske tehnologije na fizikalno-kemijska i antioksidativna svojstva vlakana izolirani iz heljdinih ljusaka su pokazali da veličina čestica utječe na udjel vlakana. Veličina čestica vlakana izolirana iz heljdinih ljusaka prije ultrafinog mljevenja iznosila je 222,41 μm , a nakon ultrafinog mljevenja veličina čestica vlakana izolirana iz heljdinih ljusaka kretala se u rasponu od 1,00 μm do 133,10 μm . Udjel ukupnih vlakana izoliran iz ljusaka heljde nakon ultrafinog mljevenja smanjio se s 86,83 % na 83,23 %. Udjel topljivih vlakna izoliran iz heljdinih ljusaka nakon ultrafinog mljevenja povećao se za 66,25 % (s 16,00 % na 26,60 %), a udjel netopljivih vlakana izoliran iz heljdinih ljusaka smanjio se s 70,27 % na 56,63 % nakon ultrafinog mljevenja, iz čega su zaključili da ultrafino mljevenje utječe na preraspodjelu vlakana u udjelu ukupnih vlakana (Zhu i sur., 2014). Ako se rezultati ovog rada uspoređuju s istraživanjima koje su proveli Zhu i suradnici (2014), vidi se povezanost veličine čestica s udjelom vlakana. Rezultati istraživanja Zhu i suradnika pokazali su da se nakon ultrafinog mljevenja vlakana izoliranih iz ljusaka heljde udjel netopljivih vlakana smanjio, a udjel topljivih vlakana se povećao, a to pokazuju i rezultati ovog rada. Udjel netopljivih vlakana bio je veći u uzorcima ljusaka heljde samljeveni na kriomlinu 8 minuta (8'KM), a udjel topljivih vlakana bio je veći u uzorcima s manjom veličinom čestica ($< 56 \mu\text{m}$), također je došlo do preraspodjele u udjelu ukupnih vlakana. Dobiveni udjeli topljivih vlakana u enzimski tretiranim uzorcima heljdinih ljusaka u ovom radu znatno su manji u odnosu na udjel topljivih vlakana koji je postignut u istraživanju Zhu i suradnika (2014), a to se može povezati s različitom veličinom čestica uzoraka, primjenjenim uvjetima tretmana, korištenim metodama kao i s podrijetlom korištene sirovine.

Ujecaj ultrafinog mljevenja na hidratacijska i antioksidacijska svojstva vlakana pšeničnih posija istraživali su Zhu i suradnici (2010). Veličina čestica praha s vlaknima kretala se od 10 nm do 620 nm, a prosječna veličina čestica iznosila je 343,5 nm. Neravnomjerna raspodjela u veličini čestica može se povezati s prirodom vlakana, a treba se uzeti u obzir i da je određena količina čestica aglomerirana. Smanjenje udjela ukupnih vlakana nakon ultrafinog mljevenja objašnjeno je razgradnjom hemiceluloze, celuloze i lignina na manje molekule. Udjel netopljivih vlakana nakon mljevenja smanjio se s 81,13 % na 68,65 %, a udjel topljivih vlakana se povećao s 2,90 % na 11,47 % (3,96 puta). Promjena u udjelima nastala je zbog preraspodjele vlakana nakon mljevenja iz netopljivih u topljiva vlakna (Zhu i sur., 2010).

4.2. KAPACITET ZADRŽAVANJA VODE

Na Slici 13 prikazani su rezultati određivanja kapaciteta zadržavanja vode usitnjenih ljusaka heljde tretiranih enzimima.



Slika 13. Kapacitet zadržavanja vode (WRC) usitnjenih ljusaka heljde tretiranih enzimima. Istim slovom označene su vrijednosti između kojih nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$)

Usitnjavanje i enzimski tretman ljusaka heljde nisu imali značajan utjecaj na kapacitet zadržavanja vode, a to je vidljivo iz dobivenih rezultata (Slika 13). U netretiranim uzorcima 8'KM 0 kapacitet zadržavanja vode iznosio je $1,57 \text{ g g}^{-1}$, a u uzorku $< 56 \mu\text{m}$ 0 postignut WRC iznosio je $2,25 \text{ g g}^{-1}$.

Neka istraživanja pokazuju da veličina čestica utječe na kapacitet zadržavanja vode. Rezultati WRC-a u istraživanju Zhu i suradnika (2010) pokazali su da mljevenje, odnosno veličina čestica, utječe na hidratacijska svojstva. Nakon mljevenja WRC pšeničnih posija smanjio se s 4,608 na 3,047. Nadalje Raghavendra i suradnici (2004, 2006) istraživali su karakteristike mljevenja i hidratacijska svojstva kokosovih vlakana te se pokazalo da smanjenje veličine čestica kokosovih vlakana na 1127 do 550 μm rezultira povećavanju hidratacijskih svojstava, a daljnjim smanjenjem veličine čestica na 550 do 390 μm hidratacijska se svojstva smanjuju.

Prema Kethireddipalliju i suradnicima, nepovoljan učinak mljevenja na hidrationska svojstva, uzrokovan je ne samo smanjenjem veličine čestica, nego i preraspodjelom strukture u matriksu vlakana (Kethireddipalli i sur., 2002).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Interakcija vrsta uzorka, vremena tretmana i udjela enzima uvelike utječe na udjel topljivih i netopljivih vlakana.
- Veći udjel IDF-a zabilježen je u uzorku 8'KM, a u uzorku < 56 μm zabilježen je veći udjel SDFP-a i SDFS-a.
- Veći udjel SDFP-a i SDFS-a postignut je u uzorcima s dodatkom 1 % enzima nego u uzorcima s dodatkom 0,1 % enzima.
- Kao optimalni uvjeti tretmana ljusaka heljde pokazali su se usitnjavanje uzorka na veličinu čestica < 56 μm , tretman u trajanju 1 sat s dodatkom 1 % celulaze i 1 % hemicelulaze.
- Pri optimalnim uvjetima (uzorak < 56 μm 1 h E 1 %), postignuto je povećanje udjela SDFP-a za 17,33 %, povećanje udjela SDFS-a 4,4 puta, te povećanje udjela SDF-a za 24,03 %.
- Tretman celulazom imao je značajniji utjecaj na povećanje udjela topljivih vlakana u tretiranim uzorcima ljusaka heljde od tretmana s hemicelulazom.
- Prema dobivenim rezultatima, usitnjavanje i enzimski tretman ljusaka heljde nisu utjecali na kapacitet zadržavanja vode.

6. LITERATURA

Abdul-Hamid, A., Luan, Y. S. (2000) Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chem.* **68**, 15–19.

Anonymous (2019) Heljda, <<https://www.vrtlarica.com/sadnja-uzgoj-heljde/>>. Pristupljeno 10. siječnja 2020.

Anonymous (2015) Heljda daje energiju i opskrbljuje B vitaminom, <<http://kako-lijeciti.blogspot.com/search?q=heljda>>. Pristupljeno 10. siječnja 2020.

AOAC Official Method 2011.25 (2011) Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods.

Back, S. H., Lee, G. H., Kang, S. (2005) Effect of Cryomilling on Particle Size and Microstrain in a WC-Co Alloy. *Mater. Trans.* **46**, 105–110.

Balasubramanian, S., Gupta, M. K., Singh, K. K. (2012) Cryogenics and its Application with Reference to Spice Grinding: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* **52**(9), 781–794.

Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R. T. (2012) Dietary fibre in foods: review. *J. Food Sci. Tech.* **49**(3), 255–266.

Dziedzic, K., Górecka, D., Kucharska, M., Przybylska, B. (2012) Influence of technological process during buckwheat groats production on dietary fibre content and sorption of bile acids. *Food Res. Int.* **47**, 279–283.

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

Goswami, T. K., Singh, M. (2003) Role of feed rate and temperature in attrition grinding of cumin. *J. Food Eng.* **59**, 285–290.

Gullion, F., Auffreta, A., Robertson, J. A., Thibault, J. F., Barry, J. L. (1998) Relationships between physical characteristics of sugar-beet fibre and its fermentability by human faecal flora. *Carbohydr. Polym.* **37**, 185–197.

Gullion, F., Champ, M. (2000) Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res. Int.* **33**, 233–245.

- Jenkins, D. J. A., Wolever, T. M. S., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Haisman, P., Dilawari, J., Goff, D. V., Meta, G. L., Albert, K. G. M. M. (1978) Dietary fibres, fibre analogues and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br. Med. J.* **1**, 1392–1394.
- Kaur, B., Srivastav, P. P. (2017) Effect of Cryogenic grinding on chemical and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) peel powder. *J. Food Process. Preserv.* **42**, 1–8.
- Kay, R. M. (1982) Dietary fibre. *J. Lipid Res.* **23**, 221–242.
- Kethireddipalli, P., Hung, Y. C., Phillips, R. D., McWatters, K. H. (2002) Evaluating the role of cell material and soluble protein in the functionality of cowpea (*Vigna unguiculata*) pastes. *J. Food Sci.* **67**, 53–59.
- Kovačević, V., Rastija, M. (2014) Žitarice, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, str. 213–215.
- Li, S. Q., Zhang, Q. H. (2001) Advances in the Development of Functional Foods from Buckwheat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41**(6), 451–464.
- Megazyme (2018) Integrated total dietary fiber, assay procedure including resistant starch and non-digestible oligosaccharides, AOAC Method 2009.01 & 2011.25 & AACC Method 32-45.01 & 32-50.01 [Updated format, 2013]. Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29, Ireland.
- Raghavendra, S. N., Ramachandra Swamy, S. R., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Kumar, S., Tharanathan, R. N. (2006) Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *J. Food Eng.* **72**, 281–286.
- Raghavendra, S. N., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Tharanathan, R. N. (2004). Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *Eur. Food Res. Technol.* **218**(6), 563–567.
- Roehrig, K. L. (1988). The physiological effects of dietary fiber. *Food Hydrocolloid.* **2**, 1–18.
- Rossel, C. M., Santos, E., Collar, C. (2009) Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. *Food Res. Int.* **42**, 176–184.

Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S. (2016) An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *J. Nutr. Food Sci.* **6**, 461–469.

Sangnark, A., Noomhorm, A. (2004) Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Res. Int.* **37**, 66–74.

Stedman, K. J., Burgoon, M. S., Lewis, B. A., Edwardson, S. E., Obendorf, R. L. (2001) Buckwheat Seed Milling Fractions: Description, Macronutrient Composition and Dietary Fibre. *J. Cer. Sci.* **33**, 271–278.

Thibault, J. F., Lahaye, M., Guillon, F. (1992) Physicochemical properties of food plant cell walls. U: Dietary fibre, a component of food. Nutritional function in health and disease, (Schweizer, T. F., Edwards, C. A., ured.), Springer, Berlin, str. 21–39.

Vahčić, N., Hruškar, M., Marković, K. (2008) Analitičke metode za određivanje osnovnih sastojaka hrane, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Vojtišková, P., Kmentová, K., Kubáň, V., Kráčmar, S. (2012) Chemical composition of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) and selected buckwheat products. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **1**, 1011–1019.

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

Zheng, Y., Li, Y. (2018) Physico-chemical and Functional properties of coconut (*Cocos nucifera L*) cake dietary fibres: Effect of cellulase hydrolysis, acid treatment and particle size distribution. *Food Chem.* **257**, 135–142.

Zhu, F., Du, B., Li, R., Li, J. (2014) Effect of micronisation technology on physico-chemical and antioxidant properties of dietary fibre from buckwheat hulls. *Biocatal. Agric. Biotech.* **3**, 30–34.

Zhu, K. X., Huang, S., Peng, W., Qian, H. F., Zhou, H. M. (2010) Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. *Food Res. Int.* **43**, 943–948.

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.

Ana-Marija Prodanović