

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2019.

Ana Antolić

1139/USH

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKOG INTEZITETA NA
AKTIVNOST POLIFENOL-
OKSIDAZE, KEMIJSKO-
FIZIKALNA SVOJSTVA I
BIOAKTIVNI POTENCIJAL
ULTRA-FINO MLJEVENIH
PŠENIČNIH POSIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Novotni Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Matee Habuš, mag. ing.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dubravki Novotni na brojnim savjetima i prenesenom znanju tijekom izrade rada.

Veliko hvala Matei Habuš, mag. ing. na pomoći, susretljivosti te uloženom trudu i vremenu pri izradi ovog rada.

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 AKTIVNOST POLIFENOL-OKSIDAZE, KEMIJSKO-FIZIKALNA SVOJSTVA I BIOAKTIVNI POTENCIJAL ULTRA-FINO MLJEVENIH PŠENIČNIH POSIJA

Ana Antolić, 1139/USH

Sažetak: *Pšenične posije predstavljaju vrijedan nusproizvod proizvodnje pšeničnog brašna zbog visokog sadržaja prehrambenih vlakana i bioaktivnih spojeva pri čemu im se stoga pripisuje blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na sadržaj slobodnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost, sposobnost bubrenja u vodi, kapacitet zadržavanja vode, aktivnost enzima polifenol-oksidge i boju ultra-fino mljevenih pšeničnih posija. Vodena suspenzija pšeničnih posija sobne temperature tretirana je (5, 10 ili 15 min) direktno uronjenom ultrazvučnom sondom ($d = 22$ mm) pri amplitudama (100%, 80% ili 60%) prema složenom centralnom planu pokusa. Usporedbom tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu utvrđeno je da tretman smanjuje aktivnost polifenol-oksidge, sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost i L^* parameter boje, a povećava a^* i b^* parameter boje, sposobnost bubrenja u vodi i kapacitet zadržavanja vode. Na taj način bi se mogla povećati stabilnost i primjenjivost pšeničnih posija.*

Ključne riječi: pšenične posije, bioaktivni spojevi, polifenol oksidge, ultrazvuk visokog intenziteta

Rad sadrži: 56 stranica, 8 slika, 7 tablica, 120 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Matea Habuš, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

Prof. dr. sc. Duška Ćurić (predsjednik)

Izv. prof. dr. sc. Dubravka Novotni (mentor)

Doc. dr. sc. Filip Dujmić (član)

Doc. dr. sc. Sven Karlović (zamjena)

Datum obrane: 12.07.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT ON POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY, CHEMICAL-PHYSICAL PROPERTIES AND BIOACTIVE POTENTIAL OF ULTRA-FINE WHEAT BRAN

Ana Antolić, 1139/USH

Abstract: *Wheat bran represents a valuable by-product of wheat flour production because of its high content of dietary fiber and bioactive compounds, and hence is attributed to a beneficial effect on human health. The aim of this paper was to investigate the effect of high intensity ultrasound on the content of free phenolic compounds, antioxidant activity, water swelling ability, water retention capacity, polyphenol oxidase activity and the color of ultra-fine wheat bran. The aqueous suspensions of wheat bran at a room temperature were treated (5, 10 or 15 min) with a directly immersed ultrasonic probe ($d = 22\text{mm}$) at amplitude (100%, 80% or 60%) according to the complex central plan of the experiment. Comparison of treated samples with respect to a control showed that the treatment decreases polyphenol oxidase activity, the content of total phenolic compounds, antioxidant activity and L^* color parameter, a increases the a^* and b^* color parameters, water swelling ability and water retention capacity. This could increase the stability and applicability of wheat bran.*

Keywords: wheat bran, bioactive compounds, polyphenol oxidase, high intensity ultrasound,

Thesis contains: 56 pages, 8 figures, 7 tables, 120 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor

Technical support and assistance: Matea Habuš, M.Eng.

Reviewers:

PhD. Duška Ćurić, Full Professor (president)

PhD. Dubravka Novotni, Associate Professor (mentor)

PhD. Filip Dujmić, Assistant Professor (member)

PhD. Sven Karlović, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 12.07.2019.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bioaktivni spojevi u pšeničnim posijama	2
2.1.1. Fenolni spojevi i ferulinska kiselina.....	3
2.1.2. Alkilresorcinoli.....	4
2.1.3. Vitamin E	4
2.1.4. Lignini i lignani	4
2.1.5. Metil donori.....	5
2.1.6. B-vitamini.....	6
2.1.7. Mineralne tvari	7
2.1.8. Fitati	8
2.2. Utjecaj ultra-finog mljevenja na antioksidacijski kapacitet	9
2.3. Utjecaj ultrazvuka visokog inteziteta na aktivnost polifenol-oksidade	10
2.4. Utjecaj veličine čestica na boju pšeničnih posija	11
2.5. Utjecaj veličine čestica na hidratacijska svojstva pšeničnih posija	12
2.6. Utjecaj ultrazvuka visokog inteziteta na hidratacijska svojstva pšeničnih posija	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Uzorci	15
3.2. Metode rada	15
3.2.1. Kriomljevenje pšeničnih posija.....	15
3.2.2. Određivanje raspodjele veličine čestica	15
3.2.3. Ultrazvučna obrada posija.....	16
3.2.4. Određivanje udjela vode	17
3.2.5. Određivanje udjela netopljivih i topljivih vlakana (prema metodi AOAC 2011.25)	18
3.2.5.1. <i>Određivanje netopljivih vlakana (IDF)</i>	20
3.2.5.2. <i>Određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP)</i>	21
3.2.5.3. <i>Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS) na HPLC-u</i>	22
3.2.6. Određivanje količine pepela u ostatku	24
3.2.7. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u (u ostatku)	24
3.2.8. Ekstrakcija slobodnih bioaktivnih spojeva	26
3.2.9. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC)	27
3.2.10. Određivanje aktivnosti polifenol-oksidade	29
3.2.11. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	30

3.2.11.1. FRAP metoda	30
3.2.11.2. DPPH metoda	32
3.2.12. Određivanje boje	34
3.2.13. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode.....	35
3.2.14. Bubrenje	35
3.3. Statistička obrada rezultata	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. Utjecaj kriomljevenja na raspodjelu veličine čestica pšeničnih posija.....	37
4.2. Sadržaj vlakana.....	37
4.3. Kinetika promjene temperature tijekom tretmana UVI.....	38
4.4. Utjecaj UVI na hidratacijska svojstva	38
4.5. Utjecaj tretmana UVI na boju.....	40
4.6. Utjecaj tretmana uvi na aktivnost polifenol-oksidade	41
4.7. Utjecaj tretmana UVI na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet pšeničnih posija	43
5. ZAKLJUČCI	46
6. LITERATURA	47

1. UVOD

Pšenične posije nastaju kao nusproizvod mljevenja pšenice te predstavljaju oko 15% mase pšeničnog zrna i sastavljene su od vanjskih slojeva zrna: vanjskog i unutarnjeg perikarpa, teste, hijalinskog i aleuronskog sloja. Ova frakcija mljevenja, zbog visokog sadržaja prehrambenih vlakana i fenolnih spojeva, sve više nailazi na povećani interes potrošača. Pšenične posije su bogate mineralnim tvarima, vlaknima, vitaminima B skupine i bioaktivnim spojevima za koje je poznato da posjeduju svojstva koja djeluju blagotvorno na zdravlje (Preuckler i sur., 2014). Povećana svijest potrošača i njihova potražnja za zdravom hranom dovela je do brojnih istraživanja i primjene sastojaka iz prirodnih izvora, gdje pšenične posije bivaju vrlo dobro iskorištene za izolaciju spojeva s povećanim dobrobitima za zdravlje. Iako se pšenične posije uglavnom koriste kao dodatak hrani za životinje, njihova uporaba za ljudsku prehranu još uvijek je manja od očekivane zbog njihovog nepovoljnog utjecaja na funkcionalna i senzorska svojstva proizvoda (Zhang i Moore, 1999; Song i sur., 2013; Hemdane i sur., 2015). Kao jedna od strategija funkcionalizacije pšeničnih posija pokazalo se smanjenje veličine čestica koje mijenja strukturu pšeničnih posija, mijenjajući time njihova fizička, kemijska i funkcionalna svojstva (Zhu i sur., 2011). Ultrazvučni tretman koji se pokazao kao ekonomičan, ekološki prihvatljiv i održiv način povećanja prijenosa mase u biljnim tkivima također je našao svoju primjenu u tretiranju pšeničnih posija u svrhu njihove bolje tehnološke iskoristivosti. Dosada je primijenjen za poboljšanje ekstrakcije spojeva na način da energija generira kavitacijsku silu za povećanje brzine prijenosa mase pri čemu nastaju mjehurići u ekstrakciji tipa tekuće/kruto koji eksplodiraju. Ovaj fenomen stvara lokalizirani pritisak koji uzrokuje pucanje biljnog tkiva i oslobađanje intracelularnih bioaktivnih spojeva (Knorr i sur., 2002). Također, ultrazvuk je primijenjen i u svrhu inaktivacije enzima koji uzrokuju nepoželjno tamnjenje hrane (Niu i sur., 2014a) te u svrhu poboljšanja hidratacijskih svojstava kukuruza (Miano i sur., 2017). Iako postoje mnogi radovi koji istražuju utjecaj smanjenja veličine čestica pšeničnih posija i tretmana ultrazvukom visokog inteziteta, dosad još nije ispitano njihovo kombinirano djelovanje, pogotovo na pšeničnim posijama.

Stoga je cilj ovog rada istražiti utjecaj obrade ultra-fino mljevenih pšeničnih posija ultrazvukom visokog inteziteta na njihov bioaktivni potencijal, aktivnost polifenol-oksidaze i kemijsko-fizikalna svojstva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bioaktivni spojevi u pšeničnim posijama

Pojam biološka aktivnost zapravo se odnosi na modulirajući učinak na bilo koji biološki proces u živoj stanici ili organizmu, međutim, često se koristi u smislu učinka na ljudsko zdravlje. Bioaktivni spojevi prisutni u pšeničnim posijama opisani su u nastavku s obzirom na njihovo antioksidacijsko djelovanje. Tipičan sadržaj bioaktivnih spojeva u pšeničnim posijama prikazan je u Tablici 1. Široki rasponi sadržaja nekih spojeva su rezultat razlike u okolišnim uvjetima, području uzgoja, genetskim faktorima i evoluciji, sorti ili metodi ekstrakcije.

Tablica 1. Bioaktivni sastojci prisutni u 100 g pšeničnih posija (Chalamacharla i sur., 2018)

Broj	Bioaktivni sastojak	Količina u 100 g pšeničnih posija
1	Fitinska kiselina	2180 – 5520 mg
2	Ferulinska kiselina	500 – 1500 mg
3	Alkilresorcinoli	220 – 400 mg
4	Lutein	97 – 140 µg
5	Željezo	11 mg
6	Magnezij	12 mg
7	Cink	7,3 mg
8	Selen	78 µg
9	Vitamin E	1,4 mg
10	Betain	1000 – 1300 mg
11	Kolin	47 – 100 mg
12	Niacin	14 – 18 mg
13	Pantotenska kiselina	2,2 – 3,9 mg
14	Riboflavin	0,39 – 0,75 mg
15	Biotin	0,048 mg
16	Tiamin	0,54 mg
17	Piridoksin	1 – 1,3 mg
18	Folat	79 – 200 µg

2.1.1. Fenolni spojevi i ferulinska kiselina

Fenolni spojevi u pšeničnim posijama su uglavnom fenoli koji sadrže jedan aromatski prsten: fenolne kiseline, kao što su ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, i *p*-kumarinska kiselina, alkilresorcinoli i vitamin E (Tablica 1), dok polifenole uglavnom čine lignini i lignani.

Fenolni spojevi pokazuju antioksidacijsku aktivnost zahvaljujući višestrukim antioksidacijskim mehanizmima. Njihova sposobnost uklanjanja slobodnih radikala je jedna od najbolje dokumentiranih. Hidroksilna skupina fenolnog prstena donira jedan elektron molekuli radikala, nakon čega slijedi brzi prijenos protona. Neto rezultat je ekvivalentan prijenosu jednog vodikovog atoma na slobodni radikal. S druge strane, fenol ostaje oksidiran. Međutim, fenolni radikal ne napreduje u oksidativnoj reakciji, jer je relativno stabilan zbog rezonance, u kojoj je nespareni elektron delokaliziran u orto ili para položaju fenilnog prstena. Konačno, oksidirani antioksidans se može pretvoriti natrag u svoj reducirani oblik pomoću enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (Graf, 1992).

Ferulinska kiselina je uobičajeni naziv za 3- (4-hidroksi-3-metoksifenil) propionsku kiselinu. Ferulinska kiselina se uglavnom nalazi u posijama pšeničnog zrna, gdje se pojavljuje u obliku *trans* izomera vezana esterskom vezom za polisaharide koji grade staničnu stijenu (Klepacka i Fornal, 2006). Antioksidacijski potencijal ferulinske kiseline uglavnom se pripisuje doniranju elektrona i prijenosu vodikovog atoma na slobodne radikale (Graf, 1992). Posjeduje sposobnost inhibicije peroksidacije lipida hvatanjem superoksida ($O_2^{\cdot-}$) te sposobnost inhibicije oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL), glavnog kolesterola u krvi (Castelluccio i sur., 1996). Radikal ferulinske kiseline (fenoksi radikal) koji nastaje njezinom oksidacijom, je vrlo stabilan i sam ne inicira oksidacijsku lančanu reakciju (Palacios, 1990), a prisutnost metoksilne skupine povećava stabilnost njegove rezonantne strukture (Zhao i Moghadasian, 2008). U slučaju zamjene metoksi skupine hidroksilnom skupinom, sposobnost uklanjanja radikala je znatno povećana (Srinivasan i sur., 2007).

Uz ferulinsku kiselinu, pšenične posije sadrže i druge hidroksicinamične kiseline s antioksidacijskom aktivnosti: kumarinsku, sinapinsku i kavnu kiselinu, ali u puno manjim količinama (Shahidi i Chandrasekara, 2010). Općenito, hidroksicinaminske kiseline te posebno ferulinska i dimerna ferulinska kiselina su specifične fitokemikalije pšeničnog zrna. One se ne nalaze u značajnim količinama u voću i povrću te to čini pšenične posije glavnim izvorom tih antioksidansa u hrani (Liu, 2007).

2.1.2. Alkilresorcinoli

Alkilresorcinoli su amfifilne molekule koje se sastoje od 2-hidroksifenolnog i alkilnog bočnog lanca različitih duljina na položaju 5, a najčešći su C15:0, C17:0, C19:0, C21:0, C23:0, i C25:0. Alkilresorcinoli se u posijama uglavnom nalaze u testu (Landberg i sur., 2008). Imaju slabu sposobnost doniranja vodika i uklanjanja peroksila (Kamal-Eldin i sur., 2001), ali zato pokazuju oksidativnu prevenciju membrana (Hladyszowski, i sur., 1998) zbog lipofilne prirode alkilnog lanca, što im daje mogućnost interakcije s fosfolipidima ili proteinima u membranama (Kamal-Eldin i sur., 2001). Dodatno, alkilresorcinoli mogu spriječiti *in vitro* oksidaciju masnoća izazvanu Fe²⁺ kiselinom (Kozubek i Tyman, 1998) i Cu⁺-induciranu oksidaciju LDL-a (Parikka i sur., 2006). Alkilresorcinoli su fitokemikalije specifične za pšenične posije i stoga se koriste kao biomarkeri u dokazivanju sastava proizvoda od cjelovitog pšeničnog brašna (Mateo Anson, 2010).

2.1.3. Vitamin E

Vitamin E je zajednički naziv za skup od osam povezanih spojeva ili vitamera : α -, β -, γ - i δ - tokoferola, i odgovarajućih četiri tokotrienola. Unatoč činjenici da svi oblici vitamina E imaju sličnu antioksidacijsku aktivnost (konstante brzine za doniranje vodika), α -tokoferol se zadržava u plazmi. To je zbog (i) specifičnog vezanja za prijenosni protein tokoferola i (ii) opsežnog jetrenog metabolizma ostalih vitamina (Traber i Atkinson, 2007). Molekula α -tokoferola sastoji se od kromanske glave odgovorne za antioksidacijsku funkciju, i fitilnog lanca s kojim interkalira s fosfolipidima iz stanične membrane. Slobodna hidroksilna skupina na aromatskom prstenu je odgovorna za antioksidacijska svojstva. Vodik iz te skupine se donira slobodnim radikalima, što rezultira nastankom relativno stabilnih slobodnih radikala vitamina E (Sies i Murphy, 1991). Na taj način molekule vitamina E mogu prekinuti lančane reakcije slobodnih radikala. Vitamin E također ima zaštitne učinke na enzime ovisne o glutationu (van Haften i sur., 2003). Nedavno je proučavana funkcija vitamina E u ljudskom tijelu i čini se da mu je glavna funkcija uklanjanje slobodnih radikala čime štiti polinezasićene masne kiseline od oksidacije, čime se održava integritet stanične membrane (Traber i Atkinson, 2007).

2.1.4. Lignini i lignani

Biopolimeri lignina imaju heterogenu strukturu; oni čine 30% biomase biljke i pripadaju najzastupljenijim organskim polimerima na zemlji. Lignini su glavna komponenta cjelovitih žitarica, a mogu činiti 3-7% posija (Fardet i sur., 2008; Bondia-Pons i sur., 2009). Njihova

polifenolna struktura daje im potencijalni antioksidacijski kapacitet (Dizhbite i sur., 2004), kao što je zaštita DNA od oštećenja (oksidativnih lezija) u stanicama (Lábaj i sur., 2004). Lignini se mogu metabolizirati u lignane sisavaca (Begum i sur., 2004).

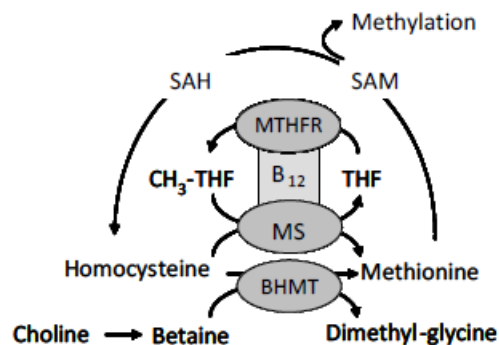
Lignani su fito-estrogeni prisutni u širokom rasponu biljnih vrsta uključujući cjelovito zrno pšenice. Skupina obuhvaća sekoizolaricresinol, matairesinol, laricresinol, pinoresinol i siringaresinol. Svi imaju polifenolne strukture i antioksidacijsko djelovanje (Fardet i sur., 2008; Bondia-Pons i sur., 2009). Lignani i njihovi metaboliti, enterodiol i enterolakton pokazuju antioksidacijsku aktivnost u različitim lipidnim i vodenim *in vitro* sustavima te smanjuju oksidaciju lipida (Kitts, 1999). Lignani imaju manje izražene učinke od lignina zbog genetskih oksidacijskih oštećenja (Pool-Zobel i sur., 2000).

2.1.5. Metil donori

Metil donori: folat, kolin i betain sudjeluju u recikliranju potencijalno toksične aminokiseline, homocisteina u metionin i, konačno, u metil donor S-adenozilmetionin (SAM). Njihovo uzajamno djelovanje prikazano je na Slici 3.

Folati su klasificirani kao B-vitamini, odnosno vitamin B₉. Prisutni su uglavnom kao reducirani oblici (tetrahidrofolati), a ne kao folna kiselina (pteroilmonoglutaminska kiselina). Tetrahidrofolati imaju različit broj glutamidskih ostataka (1-7) i mogu biti metilirani ili formilirani na N5 i N10. Među svim tim mogućim strukturama, 5-metiltetrahidrofolat je biološki glavni aktivni oblik (Slika 1). Neki oblici folata imaju svojstva uklanjanja radikala *in vitro* (Rezk i sur., 2003) i sprječavanja mitohondrijske disfunkcije i apoptoze preko intracelularnog uklanjanja superoksida (O₂⁻) (Huang i sur., 2004). Međutim, glavni mehanizam antioksidacijskog djelovanja folata je indirektan - smanjenje količine homocisteina i doniranje elektrona i vodika tetrahidrobiopterinu (H₄B), koji je bitan kofaktor endotelnoj sintazi dušikovog oksida (eNOS) u tvorbi dušikovog oksida (Hayden i Tyagi, 2004; Das, 2003).

Betain (trimetilglicin) u pšeničnom zrnu prisutan je uglavnom u mekinjama, ali se također može formirati oksidacijom kolina u jetri i bubrezima. Dva glavna načina biološkog djelovanja betaina su kao osmolit i metil donor (Craig, 2004) (Slika 1). Kolin se također nalazi u pšeničnim posijama, iako u manjim količinama od betaina (Tablica 1) te se jednako može sintetizirati u jetri (Zeisel i sur., 2003).



Slika 1. Betain i transmetilacija u metioninskom ciklusu. B12: vitamin B-12 (kobalamin); BHMT, betain homocistein metiltransferaza; MS, metionin sintaza; MTHFR, metilentetrahidrofolat reduktaza; THF, tetrahidrofolat; CH₃-THF, 5-methyltetrahydrofolate; SAM: S-adenozilmetionin; SAH: S-adenozilhomocistein (Craig, 2004).

2.1.6. B-vitamini

Pšenične posije sadrže nekoliko B-vitamina, uglavnom riboflavin, niacin i pantotensku kiselinu (Tablica 1). Žitarice i proizvodi od žitarica doprinose oko 30% dnevnog unosa ovih vitamina u prehrani (McKevith, 2004).

Niacin ili piridin-3-karboksilna kiselina je također poznat kao vitamin B₃ ili kao nikotinska kiselina. To je u vodi topiv vitamin koji obiluje u pšeničnom zrnu. Osim što se uzima iz prehrane, može se formirati i iz triptofana u jetri. Niacin je prisutan u dva prirodna oblika, slobodnom (nikotinska kiselina) i vezanom (nikotinamid). Nikotinamid se koristi za dobivanje koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP⁺). NAD⁺ i NADP⁺ služe kao donori elektrona u redoks reakcijama za preko 200 enzima, te su odgovorni za aktivnost enzima poli (ADP-riboza) polimeraza-1, uključenog u sintezu i popravak DNA (Hageman i Stierum, 2001). Niacin se koristi za liječenje dislipidemije i ateroskleroze godinama. Nedavno je objavljeno da ovaj vitamin povećava redoks stanje (NADPH, GSH) što dovodi do smanjenja oksidacije ROS i LDL (Ganji i sur., 2009), a istovremeno inhibira redoks-osjetljive gene u endotelnim stanicama aorte (Kamanna i sur., 2009).

Pantotenska kiselina ili 3 - [(2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutanoil) amino] propanska kiselina je također poznata kao vitamin B₅. To je vitamin topiv u vodi koji se ne može sintetizirati u ljudskom tijelu, ali široko dostupan u prehrani pri čemu cjelovito pšenično zrno čini dobar izvor ovog vitamina. Pantotenska kiselina i njen reducirani derivat pantotenol su prekursori

dvaju važnih enzimskih kofaktora: koenzima A (CoA) i proteinskog nosača acila (ACP). Oba kofaktora sadrže sulfhidrilnu skupinu (-SH), koja reagira s aktiviranim karboksilnim kiselinama pri čemu nastaju tioesteri. Pantotenska kiselina nije antioksidans u smislu uklanjanja radikala, ali indirektno je njen unos povezan s povećanjem sadržaja glutaciona (Slyshenkov i sur., 2004; Slyshenkov i sur., 2001).

Riboflavin ili 7,8-dimetil-10-ribitil-izoaloksazin je također poznat kao vitamin B₂. U posijama pšenice samo je mala količina riboflavina prisutna u slobodnom obliku, dok je većina prisutna kao flavin adenin dinukleotid (FAD) i manja količina kao flavin mononukleotid (FMN). Tijekom probave, FAD i FMN moraju biti hidrolizirani u riboflavin kako bi se mogli apsorbirati. FAD i FMN djeluju kao intermedijarni akceptori vodika u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona i predaju elektrone citokromskom sustavu u staničnom disanju (Powers, 2003). Riboflavin nema značajno inherentno antioksidacijsko djelovanje. Njegova snažna antioksidacijska svojstva proizlaze iz njegove uloge prekursora FAD-a i FMN-a. FAD formira reaktivno katalitičko središte glutation-reduktaze, enzima koji pretvara glutation disulfid (GSSG) u glutation (GSH) (Powers, 2003).

2.1.7. Mineralne tvari

Pšenične posije također sadrži znatne količine željeza, magnezija i cinka, kao i niže razine mnogih elemenata u tragovima, npr. selena (Tablica 1). Ti spojevi su visoko koncentrirani u aleuronskom sloju, a njihov sadržaj se uvelike razlikuje ovisno o lokaciji usjeva zbog svojstava tla. Bioraspoloživost tih minerala i elemenata u tragovima iz pšeničnih posija ovisi o tome jesu li kelirani fitatima. Uvjeti obrade koji aktiviraju fitaze mogu hidrolizirati fitate, kao što je u slučaju fermentacije, za koju se pokazalo da poboljšava bioraspoloživost minerala (Lopez i sur., 2003).

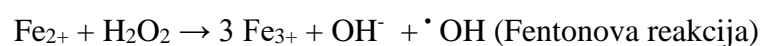
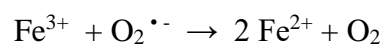
Željezo (Fe) je najzastupljeniji element u tragovima u tijelu, a gotovo sve je željezo vezano za proteine. Koncentracije slobodnog željeza su posebno niske iz dva razloga: Fe³⁺ nije topiv u vodi, a Fe²⁺ sudjeluje u stvaranju slobodnih radikala, kao što je [•]OH (Fentonova reakcija). Do povećanja koncentracije slobodnog željeza može doći zbog nedostatka proteina u hrani, velikih količina željeza u prehrani, niskih koncentracija proteina za vezanje željeza, ili ozljede stanica. To će rezultirati proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta, lipidnom peroksidacijom i oksidativnim stresom. Povećanje izvanstanične koncentracije non-heme željeza također povećava ekspresiju inducirane sintaze dušikovog oksida (iNOS) i induciranu sintezu NO u mnogim tipovima stanica, što može dodatno pogoršati oksidacijsko oštećenje stvaranjem peroksinitrita (Fang i sur., 2002).

Glavna funkcija cinka (Zn) je strukturalna – proteinske strukture zvane „zinc finger“ uključene su u DNA domene mnogih proteina, peptida, enzima, hormona, transkripcijskih faktora i faktora rasta, uključujući citokine, relevantne za održavanje homeostatskih mehanizama. „Zinc finger“ se sastoji od kratkog dijela od 28-40 aminokiselina koje sadrže karakteristične Cys₂His₂ (cistein, histidin) motive stabilizirane s jednim ili više iona cinka (Laity i sur., 2001). Cink također igra ključnu ulogu u strukturi, funkciji, stabilizaciji i fluidnosti biomembrana zbog njegovog vezanja na tiolne skupine (O'Dell, 2000). Kofaktor je Cu/Zn-superoksid dismutazi iz čega proizlazi njegovo antioksidacijsko djelovanje (Shaheen i Abd El-Fattah, 1995). S druge strane, Zn može biti jaki induktor oksidativnog stresa promicanjem mitohondrijske i ekstramitohondrijske proizvodnje reaktivnih vrsta kisika (Frazzini i sur., 2006).

Selen (Se) je bitan mineral u tragovima koji se u žitaricama uglavnom pojavljuje kao selenometionin (Se-Met). Se-Met može biti ne-specifično ugrađen u proteine kao supstitucija metioninu te se također može pretvoriti u selenocistein (Se-Cys) i u anorganski selen demetilacijom. Selenocistein čini važnu komponentu selenoproteina, kao što je selenoprotein P (glavni nosač Se u plazmi), jodotironin deiodinaza, tioredoksin reduktaza i glution peroksidaza ovisne o selenu. Sve su to selenoproteini ovisni o Se i općenito imaju selenocistein u svojim aktivnim mjestima te u njima selen djeluje kao redoks centar (Behne i Kyriakopoulos, 2001). Najpoznatiji primjer ove redoks funkcije je redukcija hidroperoksida od strane glutation peroksidaze ovisne o Se (Brown i Arthur, 2001).

2.1.8. Fitati

Fitati su generički izraz za mio-inozitol tri- (IP₃), tetra- (IP₄), penta- (IP₅) i heksa- (IP₆) fosfat. Fitinska kiselina (IP₆) predstavlja glavno skladište fosfata u sjemenu pšenice, a uglavnom se nalazi u posijama (Tablica 1). Smatra se da je njena uloga zaštita od oksidativnog oštećenja tijekom skladištenja. Antioksidacijska aktivnost fitinske kiseline uglavnom se pripisuje keliranju željeza, što prekida reakcije Haber-Weissovog ciklusa:



Kao posljedica toga, spriječeno je stvaranje hidroksilnih radikala ($\bullet\text{OH}$) pri čemu se istovremeno može spriječiti lipidna peroksidacija (Graf, 1983). Također se pokazalo da fitinska kiselina inhibira stvaranje $\text{O}_2^{\bullet -}$ radikala posredovano ksantin oksidazom (Muraoka i Miura, 2004). Fitinsku kiselinu iz hrane tijekom digestije hidrolizira fitaza, koja cijepa

fosfatne skupine s inozitolskog prstena što smanjuje kelirajuću aktivnost fitata (Miyamoto i sur., 2000).

2.2. Utjecaj ultra-finog mljevenja na antioksidacijski kapacitet

Kao što je gore navedeno, pšenične posije sadrže najzastupljenije fenolne spojeve pšeničnog zrna - fenolne kiseline. Glavna fenolna kiselina je ferulinska kiselina (Antoine i sur., 2004), dok su sinapinska, p-kumarinska, vanilinska i kavna kiselina otkrivene u manjim količinama. Ferulinska kiselina je uglavnom prisutna u netopljivom obliku esterificirana polimerima koji grade stanične zidove (uglavnom arabinoksilani) u perikarpu i aleuronu (Barron i sur., 2007; Parker i sur., 2005). Fenolne kiseline imaju sposobnost otklanjanja slobodnih radikala sprječavajući tako oksidaciju biološki važnih molekula zbog njihovih 1,2-dihidroksifenilnih skupina. Ukupan sadržaj fenola frakcija pšenice pozitivno korelira s njihovim antioksidacijskim kapacitetom (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2006), a smatra se da je ferulinska kiselina glavni čimbenik koji doprinosi antioksidacijskom kapacitetu (Mateo Anson i sur., 2008). Antioksidacijski kapacitet frakcija pšenice obično se određuje pomoću različitih tipova ekstrakcija. Na primjer, etanol, voda, aceton, metanol i također kombinacija otapala daju različite vrste rezultata (Yu i Moore, 2008). Međutim, dobiveni ekstrakti ne predstavljaju pravi antioksidacijski kapacitet koji bi prehrambeni proizvod mogao imati *in vivo* nakon ingestije u organizam (Gokmen i sur., 2009).

Pošto su sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet visoko koreliraju, fizička struktura pšeničnih posija utječe na njihovu antioksidacijski aktivnost (Noort i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da je na parametre kao što su granulometrijska raspodjela čestica, brzina smanjenja veličine čestica, i disocijacija različitih slojeva posija tijekom mljevenja uvelike utjecala temperatura. Kada se temperatura smanjuje ispod "krhke točke" materijala, njegova fragmentacija u ultrafine čestice je olakšana i to ponašanje je povezano sa sastavom materijala i njegovim termomehaničkim svojstvima. Proučavanja termomehaničkih svojstava pšeničnih posija i slojeva pšeničnih posija pokazala su da zbog prisutnosti lipidnih spojeva u kutikuli teste i hijalinskom sloju, stakleni prijelaz može se detektirati na 46°C unutar međuslojeva. Zbog toga je uočena razlika u ponašanju posija pri mjevenju na sobnoj temperaturi i kriogenim temperaturama. U kriogenim uvjetima (ispod 46°C) intermedijarni slojevi pšeničnih posija postaju kruti te svi slojevi koji čine posije pokazuju povećanu krutost i slično nisku rastezljivost. Kako posije postaju krhke, lakše se fragmentiraju te to dovodi do ubrzanog smanjenja veličine čestica. S druge strane, razdvajanje slojeva posija je na niskim temperaturama ograničeno te istodobno dovodi do pucanja tkiva. Kriogeno mljevenje

rezultira u bržoj fragmentaciji posija u fine čestice, i većem udjelu kompozitnih čestica. Stoga povećana antioksidacijska aktivnost ultra-fino mljevenih pšeničnih posija nije povezana s oslobađanjem aleuronskih intracelularnih spojeva niti s oslobađanjem fenolnih kiselina u njihovim konjugiranim ili slobodnim oblicima već povećanim s izlaganjem slobodnih fenolnih skupina (Chalamacharla i sur., 2018).

U pšeničnim posijama, ferulinska kiselina nalazi se zarobljena u matrici stanične stijenke te bi stoga destrukcija matrice stanične stijenke trebala povećati dostupnost ferulinske kiseline i tako poboljšati antioksidacijski kapacitet pšeničnih posija. Osim toga, ultra-fino mljevenje može se koristiti za mijenjanje fizičke strukture matrice žitarica, povećavajući površinu čestica i stoga izlaganje antioksidacijskih spojeva. Ultra-fino mljevenje su koristili Hemery i sur. (2010) kako bi se povećala biodostupnost fenolnih kiselina iz pšeničnih posija. Autori su primijetili da je smanjenje veličine čestica u korelaciji s povećanjem bioloških dostupnih fenolnih kiselina (uglavnom sinapskih i ferulinskih), dobivenih u uzorcima dijalizata pomoću dinamičkog računalno - kontroliranog *in vitro* gastrointestinalnog modela. Zhou i sur. (2004) pokazali su da mikronizacija povećava antioksidacijsku aktivnost aleurona koja se mjeri sposobnošću acetonskih ekstrakata za hvatanje različitih kisikovih i dušikovih slobodnih radikala (DPPH[•], O₂^{•-}, ABTS^{•+}). Povećanje površine čestica je vjerojatno dovelo do većeg kontakta između čestica i slobodnih radikala. Međutim, dostupni su ograničeni podaci o izravnoj vezi između raspodjele veličine čestica, specifična površine i antioksidacijske aktivnosti pšeničnih posija.

2.3. Utjecaj ultrazvuka visokog inteziteta na aktivnost polifenol-oksidge

Polifenol - oksidge (engl. Polyphenol – oxidase, PPO) je enzim koji katalizira oksidaciju *o*-difenola na *o*-kinone kao i *o*-hidroksilaciju monofenola gdje pritom ima puno veću difenol - oksidge aktivnost naprama monofenol - hidroksilaznoj aktivnosti. PPO je široko rasprostranjena u prirodi, uglavnom se nalazi u biljkama, ali i u mikroorganizama te nekim životinjskim organima (Chen i sur., 1991). U metabolizmu biljaka, PPO ima funkcionalnu ulogu u regulaciji respiracije, intermedijarnom metabolizmu, zacjeljivanju rana te antibiotskom djelovanju (Mason, 1995). Uz istraživanja njegove uloge u metabolizmu biljaka bio predmet temeljnih biokemijskih istraživanja (Zhou i sur., 1993; Irwin i sur., 1994; Ngalani i sur., 1993), no njegova fiziološka uloga još uvijek predstavlja izazovno pitanje. Štoviše, ima određene strukturalne i funkcionalne značajke, što ga čini zanimljivim sustavom za kemičare i enzimologe. Polifenol - oksidge izolirane iz hrane su oligomeri i sadrže jednu prostetičku

skupinu bakra po podjedinici (Richardson i sur., 1985). Kao i druga svojstva, kvartarna struktura PPO se također razlikuje s obzirom na izvor enzima. PPO reagiraju s fenolnim supstratima gdje se aromatski prsten fenolnih spojeva veže na aktivno mjesto enzima. PPO iz različitih izvora pokazuju aktivnost sa supstratima uključujući 4-metil-katehol, dihidroksifenilalanin (DOPA), katehol i klorogensku kiselinu (Chilaka i sur., 1993). Ovaj enzim je uključen u tamnjenje pšeničnih proizvoda zbog svog oksidativnog učinka na endogenim fenolima u prisutnosti kisika. Kako su fenolni spojevi uglavnom prisutni u posijama pšenice, oni nakon mljevenja reagiraju s endogenom PPO što uzrokuju promjenu boje proizvoda (Beta i sur., 2005), što ne biva prihvaćeno od strane potrošača. Stoga je inaktivacija PPO od vitalne važnosti u prevenciji enzimskog tamnjenja proizvoda od cjelovitog pšeničnog brašna.

Jedan od mogućih načina inaktivacije PPO predstavlja tretman ultrazvukom visokog inteziteta. Ultrazvučni tretman predstavlja novu tehnologiju koja se primjenjuje za produljenje roka trajanja, poboljšavanje stabilnosti tijekom skladištenja kao i sprečavanje tamnjenja proizvoda od cjelovitog brašna. Još uvijek se ne koristi često, ali ukazuje na veliki potencijal. Ultrazvuk može inaktivirati enzim putem lize stanice koristeći energiju vibracija, koja proizvodi kavitacijske mjehuriće i privremeno stvara mjesta ekstremno visokog tlaka i temperature kada dođe do implodiranja (Morris i sur., 2007). Niu i suradnici (2014a) su koristili ultrazvuk u kombinaciji s askorbinskom kiselinom ili glutationom za deaktiviranje PPO u proizvodima od cjelovitog pšeničnog brašna pri čemu su uočili da kombinacija ultrazvuka s tim redukcijskim sredstvima značajno smanjuje aktivnost PPO u proizvodima od cjelovitog pšeničnog brašna i sprječava enzimsko posmeđivanje svježe tjestenine od cjelovitog brašna. Štoviše, toplinska svojstva, mineralne tvari i vitamini B skupine kod proizvoda od cjelovitog brašna, kao i teksturalna svojstva svježe tjestenine od cjelovitog brašna su ostala gotovo nepromijenjena.

2.4. Utjecaj veličine čestica na boju pšeničnih posija

Također, pokazalo se i da smanjenje veličine čestica posija utječe na boju proizvoda. Niu i sur. (2014b) su proučavali utjecaj ultra-fino mljevenog cjelovitog pšeničnog brašna na kvalitetu sirovih rezanaca gdje su prijavili da smanjenje veličine čestica pšeničnih posija dovodi do većeg oslobađanja polifenol - oksidaze, što izaziva jače enzimsko-oksidacijsko tamnjenje tijekom procesa pripreme rezanaca dajući tako rezancima tamniju boju.

Niu i sur. (2014c) otkrili su da je grubo mljeveno cjelovito pšenično brašno imalo veće L^* vrijednosti (mjera svjetline) od fino mljevenog cjelovitog pšeničnog brašna, smatrajući da

smanjenje veličine čestica dovodi do nastanka tamnije boje brašna, što bi mogao biti jedan od razloga za pojavu tamnijih rezanaca s manjim česticama pšeničnih posija. S druge strane, oksidacija i Maillardove reakcije koje dovode do nastanka spojeva odgovornih za davanje boje i okusa također mogu biti zaslužne za snižavanje vrijednosti L^* kod instant prženih rezanaca s manjim česticama posija (Yang i sur., 2014). Ranija istraživanja pokazala su da na boju kineskih rezanaca utječu spojevi iz brašna na koje je djelovala polifenol oksidaza (Wang i sur., 2011).

Stoga se u ovom radu nastoji ispitati ujedno i utjecaj smanjenja veličine čestica i tretman ultrazvukom visokog inteziteta na aktivnost polifenol-oksidaze i posljedično na boju pšeničnih posija.

2.5. Utjecaj veličine čestica na hidratacijska svojstva pšeničnih posija

Zanimanje za razvojem hrane obogaćene prehranbenim vlaknima značajno je poraslo kao rezultat povećanja svijesti o zdravlju među potrošačima i prehrambenoj industriji. Kruh se, kao osnovna namirnica predstavlja idealnim nosačem prehranbenih vlakana. Kao dopuna pšeničnom brašnu nakon mljevenja, jedan od najočitijih izvora prehranbenih vlakana u pekarskoj industriji su pšenične posije (Vetter, 1984). Ugradnja pšeničnih posija, međutim, negativno utječe na preradu i organoleptička svojstva kruha i drugih proizvoda na bazi žitarica. Kao rezultat toga, takvi posijama obogaćeni proizvodi manje privlače većinu potrošača (Albers i sur., 2009; Zhang i Moore, 1999). Iako su negativni učinci pšeničnih posija na svojstva kruha bili detaljno proučavani, mehanizmi odgovorni za gubitak kvalitete ostaju nejasni, što čini ciljano rješavanje problema teže.

U istraživanjima koja se odnose na ugradnju posija u kruh često se javljaju opažanja povećane apsorpcije vode pri dodavanju posija (Zhang i Moore, 1997). Ovo je ilustracija karakterističnih hidratacijskih svojstava posija koja su potencijalno uključena u nepovoljan utjecaj mekinja na izradu kruha. U skladu s tim, Roozendaal i sur. (2012) opisali su posije kao higroskopni materijal koji se aktivno natječe za vodu s drugim ključnim komponentama brašna kao što su škrob i gluten. Štoviše, Lai i sur. (1989) navode da su učinci posija na proizvodnju kruha funkcija međudjelovanja vode i posija. Također, Dreese i Hosney (1982) i Rogers i Hosney (1982) postavili su hipotezu o mehanizmima putem kojih bi interakcija posija s vodom mogla utjecati na izradu kruha. Tvrde da višak vode apsorbiran u tijestima obogaćenim posijama postaje dostupan za želatinizaciju škroba tijekom pečenja što snižava želatinizacijsku temperaturu škroba i konačno smanjuje konačni volumen kruha. To bi mogla biti uvjerljiva pretpostavka jer Roozendaal i sur. (2012) ističu da posije oslobađaju

apsorbiranu vodu tijekom zagrijavanja. Druga hipoteza, koju su predložili Li i sur. (2012), obuhvaća formiranje arabinoksilanskih gelova u brašnu od cjelovitog pšeničnog zrna koji uzrokuju migraciju vode iz glutena u arabinoksilanske gelove i time rezultiraju lošijom kvalitetom pečenja.

Za potvrdu ili odbacivanje takvih hipoteza, potrebno je duboko razumijevanje interakcije između pšeničnih posija i vode. U tu svrhu, prethodno su korištene mnoge metode. Tako se određivanje sposobnosti zadržavanja vode prema AACCC Međunarodnoj metodi 56-11.02, također poznato kao sposobnost vezanja vode, pomoću namakanja i centrifugiranja najčešće koristi. Kapacitet zadržavanja vode definira se kao količina vode koja ostaje vezana za hidrirana vlakna nakon primjene vanjske sile (Auffret i sur., 1994; Zhang i Moore, 1997). Druga metoda je određivanje kapaciteta bubrenja koji je definiran kao ravnotežni volumen dobiveni nakon hidratacije definirane mase vlakana u prisutnosti viška vode (Kuniak i Marchess, 1972).

Mnoga istraživanja pokazuju da hidrationska svojstva pšeničnih posija uglavnom ovise o veličini čestica. Naročito kada se hidrationska svojstva procjenjuju na temelju sposobnosti zadržavanja vode i sposobnosti bubrenja, veličina čestica posija predstavlja ključan faktor. U tom slučaju, velike čestice obično zauzimaju više vode u usporedbi s malim česticama (Auffret i sur., 1994; Zhang i Moore, 1997).

Za zaključiti je da se navode različita i naizgled kontradiktorna opažanja u pogledu hidrationskih svojstava pšeničnih posija, dok mehanizmi za objašnjenje tih opažanja nisu još dostupni.

2.6. Utjecaj ultrazvuka visokog inteziteta na hidrationska svojstva pšeničnih posija

Ultrazvučni tretman također je primjenjivan u svrhu poboljšanja hidrationskih svojstava žitarica. Dokazano je da povećava brzinu hidratacije te ravnotežnu vlažnost u zrnu kukuruza (Miano i sur., 2016). Slični rezultati su također prijavljeni za slanutak (Yildirim i sur., 2013) i zrno sirka (Patero i Augusto, 2015). Glavni mehanizmi poboljšanja hidrationskih svojstava koje su ti radovi opisali bili su neizravni (stvaranje mikrokanala akustičnom kavitacijom) i izravni (efekt inercijskog protoka i spužve). Izravni učinci nastaju zbog kontrakcije i ekspanzije tkiva i stanica nastalih kompresijom i razgradnjom ultrazvučnih valova koji uzrokuju pumpanje tekućine ili inercijalni tok. To se naziva učinkom spužve zbog sličnosti spužve kada je stisnuta i puštena više puta. S druge strane, ultrazvučni valovi također uzrokuje akustičnu kavitaciju. Zbog razlike tlaka u tekućini (vodi), mjehurići plina počinju rasti dok ne eksplodiraju s visokom energijom, uzrokujući pucanje stanice. Ovaj neizravni

učinak uzrokuje formaciju mikrošupljina i mikrokanala važnih za prijenos tvari (Miano i sur., 2016). Mnogi radovi o hidrataciji te pojave smatraju glavnim uzrocima poboljšanja procesa (Ghafoor i sur., 2014; Yildirim i sur., 2013). U ovom radu nastoji se istražiti utjecaj tretmana ultrazvukom visokog inteziteta na hidratacijska svojstva pšeničnih posija promatrana kroz kapacitet bubrenja i sposobnost zadržavanja vode.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorci

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada ispitan je utjecaj kriomljevenja i ultrazvuka visokog inteziteta na sadržaj ukupnih fenola nakon ekstrakcije slobodnih spojeva, aktivnost polifenol-oksidade, antioksidacijsku aktivnost, kapacitet zadržavanja vode, bubrenje, boju, udjel netopljivih vlakana i vlakana topljivih u vodi, u uzorcima frakcije posija pšenice. Za provedbu ovog istraživanja korištena je frakcija posija obične pšenice, uzeta iz industrijske prerade tvrtke Granolio (Zagreb, Hrvatska). Kemijski sastav prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kemijski sastav pšeničnih posija (% na suhu tvar)

Uzorak	Voda	Pepeo	Proteini	Masti
Pšenične posije	12,27 ± 0,09	3,57 ± 0,03	17,84 ± 0,14	4,29 ± 0,01

Sadržaj i sastav prehrambenih vlakana određen je u sklopu ovog diplomskog rada i prikazan je u poglavlju Rezultati.

3.2. Metode rada

3.2.1. Kriomljevenje pšeničnih posija

Kriomljevenje pšeničnih posija je provedeno na kugličnom mlinu uz hlađenje tekućim dušikom (Cryomill, Retsch, Njemačka). Uzorci pšeničnih posija prosa mljeveni su u trajanju od 12 minuta. Mljevene posije su prosijavane na situ promjera otvora 50 μm te dodatno mljevene dok čestice nisu bile manje od 50 μm. Uzorci su skladišteni na temperaturi od -18 °C do tretmana ultrazvukom.

3.2.2. Određivanje raspodjele veličine čestica

Uređaji i oprema:

- laserski analizator veličine čestica Malvern 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, Velika Britanija)

Princip određivanja:

Raspodjela veličine čestica pšeničnih posija dobivenih kriogenim mljevenjem uz primjenu tekućeg dušika analizirana je pomoću metode laserske difrakcije. Za analizu korišten je laserski analizator veličine čestica Malvern 2000 (Malvern Instruments Ltd. Worchestershire, Velika Britanija), koji je opremljen jedinicom za suhu disperziju Scirocco 2000 i povezan s računalom s Mastersizer 2000 softwareom v. 5.60.

Postupak određivanja:

Uzorak posija je usipan u kadnicu jedinice za suhu disperziju koja 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 su provedena tri paralelna mjerenja ($n = 3$). Brzina snabdijevanja ćelije uzorkom i tlak zraka su prilagođavani tijekom mjerenja kako bi se održala konstantnost zasićenja laserske zrake (Benković, 2013). Konačna raspodjela veličina čestica izražena je kao srednja vrijednost.

3.2.3. Ultrazvučna obrada posija

Uzorci su tretirani ultrazvučnim procesorom UP400S (Hielscher, Njemačka) snage 400 W, frekvencije titranja 24 kHz, sa sondom promjera 22 mm pri 100 %, 80 % i 60 % amplitude ultrazvučnog vala, u trajanju od 5, 10 i 15 minuta. Tretman ultrazvukom visokog intenziteta proveden je u staklenoj čaši volumena 500 mL s 15 g uzorka pšeničnih posija i 100 mL vode. Kontrolni uzorak (NULA) je podvrgnut namakanju u destiliranoj vodi kroz 15 minuta bez tretmana ultrazvukom. Svaki tretman je proveden u dvije paralele. Nakon tretmana uzorci su liofilizirani na liofilizatoru, model Christ Alpha 1-4 LSC plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka) i čuvani pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Amplituda i vrijeme tretmana pojedinog uzorka pšeničnih posija prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti tretmana uzoraka pšeničnih posija ultrazvukom visokog intenziteta

Uzorak	Amplituda (%)	Vrijeme (min)
1+2	100	15
3+4	60	15
5+6	80	10
7+8	60	5
9+10	100	5
NULA	-	15

3.2.4. Određivanje udjela vode

Uređaji i oprema:

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

Postupak određivanja:

U prethodno osušenu, ohlađenu i izvaganu aluminijsku posudicu izvagano je $2,0000 \pm 0,0005$ g uzorka. Uzorak je sušen u sušioniku pri $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, do postizanja konstantne mase (Pravilnik, NN 28/2011). Prije vaganja uzorak je ohlađen u eksikatoru.

Iz razlike u masi uzorka izračunat je udjel vode prema jednadžbi [1] i udjel suhe tvari prema jednadžbi [2]:

$$\text{udjel vlage (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad [1]$$

$$\text{udjel suhe tvari (\%)} = 100\% - \text{udjel vlage (\%)} \quad [2]$$

m_1 – masa prazne posudice (g)

m_2 – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

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

Kemikalije:

- enzimski set za određivanje vlakana K-INTDF 03/11 (Megazyme, Irska)
- etanol, 95% (v/v) (denaturirani, Kefo, Hrvatska)
- etanol, 78% (v/v) (Priprema: u odmjernu tikvicu od 1 L doda se 180 mL destilirane vode i nadopuni 95 %-tnim etanolom do oznake.)
- smola Amberlite 200CNa (Dow, SAD) (aktivacija natapanjem 30 minuta u dvostruko većem volumenu 7 % HCl, potom ispiranje)
- smola Amberlite FPA53 (Dow, SAD)
- aceton pro analysi (Gram-mol d.o.o., Hrvatska)
- celit analytical grade (Megazyme, Irska)
- destilirana voda
- natrij-maleatni pufer, 50 mM, pH 6,0 s 2 mM kalcij klorid dihidratom ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) (Priprema: u 800 mL vode u odmjerne tikvici od 1 L otopi se 5,8 g maleinske kiseline te potom podesi pH na 6,0 s 4 M NaOH. Doda se 0,3 g kalcijevog klorida dihidrata i nadopuni tikvica do oznake.)
- otopina pankreasne α -amilaze (50 jedinica mL^{-1} , Megazyme kit) i amiloglukozidaze (AMG, Megazyme kit) (3,4 jedinice mL^{-1}) (Priprema: otopi se 0,15 g čiste pankreasne α -amilaze ($100000 \text{ jed g}^{-1}$) u 290 mL maleatnog pufera (50 Mm, pH 6,0 s 2 mM CaCl_2) i miješa 5 min na magnetskoj mješalici, a zatim se doda 0,3 mL AMG.)
- Trizma® Base (Sigma cat. No. T-1503), 0,75 M (Priprema: otopi se 90,8 g Trizma® Base u 800 mL deionizirane vode, volumen se podesi na 1 L.)
- octena kiselina, 2 M (Priprema: 115 mL ledene octene kiseline (99,5 %, Macron) pipetira se u odmjernu tikvicu obujma 1 L i razrijedi se do oznake deioniziranom vodom.)
- D-sorbitol, Megazyme kit (Priprema: vodena otopina koncentracije $100,4 \text{ mg mL}^{-1}$)

Uređaji i oprema:

- analitička vaga ALS220-4N (Kern, Njemačka)
- vodena kupelj s tresilicom SBS40 (Stuart, UK)

- rotavapor (Hiedolph, Njemačka)
- pH metar JENWAY 3510 (UK)
- magnetska miješalica, IKA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
- termometar Quartz
- sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)
- mufolna peć KR170 (W. C. Heraeus, Njemačka)
- HPLC uređaj, Shimadzu
 - o pumpa LC-10AD, Shimadzu
 - o odzračivač DGU-14A, Shimadzu
 - o pećnica CTO-10AS, Shimadzu
 - o detektor indeksa loma RID-10A, Shimadzu
 - o program LCsolution Version 1.22 SP1, Shimadzu
- staklene Duran boce s čepom (1, 250 i 500 mL)
- lončići za filtraciju, Duran 2
- odsisna boca
- stakleni adapter za lončiće za filtraciju
- gumeni prsten
- eksikator
- graduirane pipete (20 mL)
- menzura (50 mL, 100 mL, 1 L)
- okrugla tikvica s ravnim dnom (250 mL, 500 mL)
- plastične Eppendorf epruvete (1,5 mL)
- plastične Falcon epruvete (15 mL, 50 mL)
- gumena propipeta
- set magneta
- kolona za deionizaciju
- alu-folija
- staklena čaša (100 mL)
- vata

Priprema lončića:

Lončići su spaljivani u mufolnoj peći na 525 °C kroz 7 h nakon čega su ohlađeni. Zatim su namakani u 2%-tnoj otopini za čišćenje na sobnoj temperaturi kroz 1 h nakon čega su isprani

vodom i destiliranom vodom, a za konačno ispiranje korišteno je 15 mL acetona te su pušteni da se osuše na zraku. Na suhe lončiče je dodano oko 1 g celita te su stavljeni na sušenje na 130 °C do konstantne mase. Lončići su ohlađeni u eksikatoru te je izvagana i zapisana njihova masa.

Priprema uzorka:

Za analizu su korištene kriogeno samljeve posije čestica manjih od 50 μm . Izvagano je $1,000 \pm 0,0050$ g uzorka u duplikatu u Duran boce od 250 mL s čepom te je uzorak navlažen s 1 mL 95%-tnog etanola. Pripremljena je otopina pankreasne α -amilaze i amiloglukozidaze u N-maleatnom puferu koncentracije pankreasne α -amilaze 50 jedinica mL^{-1} i koncentracije amiloglukozidaze 3,4 jedinice mL^{-1} . Pripremljena otopina homogenizirana je 5 minuta na magnetskoj miješalici nakon čega je uzorku dodano 40 mL iste. Tako pripremljeni uzorak homogeniziran je na magnetskoj miješalici 5 minuta prije inkubacije. Uzorak je zatim inkubiran 16 h u vodenoj kupelji, pri 37 °C, uz orbitalno miješanje brzinom 120 okr. min^{-1} . Nakon 16 sati inkubacije reakcija je zaustavljena dodatkom 3,0 mL 0,75 M Trizma pufera. Uzorak je potom homogeniziran na magnetskoj miješalici 2 minute i stavljen u drugu vodenu kupelj temperiranu na 90 – 100 °C, 20 minuta, pri čemu je vrijeme mjereno nakon što je uzorak postigao temperaturu od 90 °C. Nakon 20 minuta, uzorak je ohlađen na temperaturu od 60 °C, a zatim mu je dodano 100 μL otopine proteaze. Uzorak je homogeniziran 2 minute na magnetskoj miješalici te potom stavljen na inkubaciju u vodenu kupelj 30 minuta, pri 60 °C, uz orbitalno miješanje brzinom 120 okr. min^{-1} . Po isteku vremena, uzorak je izvađen iz kupelji te mu je odmah dodano 4 mL 2 M octene kiseline i 1 mL otopine internog standarda sorbitola. Uzorak je homogeniziran 1 minutu na magnetskoj miješalici te je bio spreman za filtraciju.

3.2.5.1. Određivanje netopljivih vlakana (IDF)

Postupak određivanja:

Prethodno osušen i izvagan lončić s celitom se namoči s 15 mL 78%-tnog etanola, poravna i posuši pod vakuumom da bude mat. Potom se otopina uzorka i enzima profiltrira tako da se Duran boca ispire 7 puta sa po 5 mL destilirane vode zagrijane na 60 °C. Sakupljeni filtrat se podesi na volumen 85 mL u Duran boce od 500 mL i sačuva za određivanje topljivih vlakana. Ostatak na lončiću se ispere sa po dvije porcije od 15 mL slijedećeg: 78%-tni etanol, 95%-tni etanol i aceton pri čemu se filtrat od ispiranja baca. Lončići se osuše na 105 °C preko noći

prekriveni alu-folijom i nakon hlađenja u eksikatoru izvažu. Masa IDF izračunata je prema jednadžbi [3]:

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

m_1 – masa IDF u uzorku (g)

m_2 – masa lončića s celitom (g)

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

U jednom preostalom ostatku određen je udjel proteina, u drugom udjel pepela (prema metodama u poglavljima 3.2.7. i 3.2.6.) te je masa IDF korigirana s obzirom na udjel proteina i pepela prema jednadžbi [4]:

$$m_2 = \frac{m_1 - \frac{\text{udjel proteina (\%)} \times m_1}{100} - \frac{\text{udjel pepela (\%)} \times m_1}{100} - sp}{m_3} \quad [4]$$

m_1 – masa IDF u uzorku (g)

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

m_3 – masa uzorka uzetog u analizu (g)

sp – slijepa proba (g)

Udjel suhe tvari u uzorku određen je prema metodi u poglavlju 3.2.4. i rezultat je izražen kao masa IDF u 100 g suhe tvari (g) prema jednadžbi [5]:

$$m \text{ (IDF)} = \frac{m_1}{\text{udjel suhe tvari (\%)}} \times 100 \quad [5]$$

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

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

3.2.5.2. Određivanje topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP)

Postupak određivanja:

Filtrat za određivanje topljivih vlakana zagrije se na 60 °C te se doda 340 mL 95%-tnog etanola zagrijanog na 60 °C. Otopina se ručno dobro promiješa 2 min te se ostavi taložiti na sobnoj temperaturi 60 min nakon čega se filtrira pod vakuumom pri čemu se sadržaj boce kvantitativno prenosi sa 78%-tnim etanolom. Filtrat se sačuva za određivanje topljiva vlakna

male molekulske mase (SDFS) na HPLC-u. Ostatak na lončiću se osuši i korigira za proteine i pepeo kao i kod određivanja netopljivih vlakana.

Masa SDFP izračunata je prema jednadžbi [6]:

$$m_1 = m_3 - m_2 \quad [6]$$

m_1 – masa SDFP iz uzorka (g)

m_2 – masa lončića s celitom (g)

m_3 – masa lončića s celitom i SDFP (g)

U jednom preostalom ostatku određen je udjel proteina, a u drugom udjel pepela (prema metodama u poglavljima 3.2.7. i 3.2.6.) te je SDFP je korigirana s obzirom na udjel proteina i pepela prema jednadžbi [7]:

$$m_2 = \frac{m_1 - \frac{\text{udjel proteina (\%)} \times m_1}{100} - \frac{\text{udjel pepela (\%)} \times m_1}{100} - sp}{m_3} \quad [7]$$

m_1 – masa SDFP iz uzorka (g)

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

m_3 – masa uzorka uzetog u analizu (g)

sp – slijepa proba (g)

Udjel suhe tvari u uzorku određen je prema metodi u poglavlju 3.2.4. i rezultat je izražen kao masa SDFP u 100 g suhe tvari prema jednadžbi [8]:

$$m \text{ (SDFP)} = \frac{m_1}{\text{udjel suhe tvari (\%)}} \times 100 \quad [8]$$

$m \text{ (SDFP)}$ – masa SDFP u 100 g suhe tvari uzorka (g)

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

3.2.5.3. *Određivanje topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS) na HPLC-u*

Postupak određivanja:

Prvenstveno je potrebno polovinu oba filtrata sačuvanih za određivanje SDFS prenijeti u tikvicu za otparavanje od 500 mL (svaki zasebno) i otpariti do suha pod vakuumom na 60°C. Tikvica se ispere s 5 mL deionizirane vode i okreće oko 2 min dok se sve ne otopi, nakon

čega se otopina prenese u polipropilensku bočicu s čepom od 20 mL i čuva za daljnju analizu do drugog dana.

Uzorak je potom potrebno deionizirati. Najprije je odvagano 4 g smole Amberlite 200CNa i 4 g smole Amberlite FPA53 u čašu te je dodano malo vode, sadržaj je dobro homogeniziran i preliven u kolonu za deionizaciju s otvorenim ventilom. Na vrh smole u koloni stavljeno je malo vate te je kolona potom isprana s 20 mL vode. Na kolonu je naneseo 2 mL uzorka te potom 2 mL vode. Protok elucije iznosio je 1 mL min⁻¹ (1 kapi u 3 sekunde). Nakon elucije uzorka, na kolonu je dodano 20 mL vode i eluirano istom brzinom u plastičnu epruvetu od 50 mL. Eluat je prebačen u tikvicu za uparavanje od 250 mL i uparen na rotavaporu uz vakuum pri 60 °C do suhog. Upareni uzorak otopljen je u 2 mL vode, uz rotaciju 2 minute na rotavaporu. Ovako pripremljeni uzorak filtriran je preko 0,45 µm filtera za špricu, prebačen u plastičnu Eppendorf epruvetu od 1,5 mL i čuvan zamrznut do određivanja HPLC metodom.

SDFS određena su na HPLC uređaju s detektorom indeksa loma (RI) pri sljedećim uvjetima analize:

Kolona: METACARB 67C, Agilent Technologies

Mobilna faza: vodena otopina kalcij dinatrij EDTA hidrata, 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

Masa SDFS (mg 100 g⁻¹) izračunata je prema jednadžbi [9]:

$$m(SDFS) = R_f \times m(IS) \times \frac{PA_{SDFS}}{PA_{IS}} \times \frac{100}{m} \quad [9]$$

m(SDFS) – masa topljivih vlakana (mg 100 g⁻¹)

R_f – faktor odgovora

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

PA_{SDFS} – površina pika topljivih vlakana

PA_{IS} – površina pika internog standarda

m – masa uzorka čiji filtrat je analiziran (g)

3.2.6. Određivanje količine pepela u ostatku

Uređaji i oprema:

- mufolna peć KR170 (W. C. Heraeus, Njemačka)
- eksikator
- analitička vaga ALS220-4N (Kern, Njemačka)

Postupak određivanja:

Lončić s uzorkom spaljivan je u mufolnoj peći 5 sati pri 525 °C, potom je ohlađen u eksikatoru i izvagan. Udjel pepela u uzorku izračunat je prema jednadžbi [10]:

$$\text{količina pepela (\%)} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100 \quad [10]$$

m_1 – masa vlakana bez korekcije [g]

m_2 – masa lončića s celitom [g]

m_3 – masa lončića s celitom i pepelom [g]

3.2.7. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u (u ostatku)

Kemikalije:

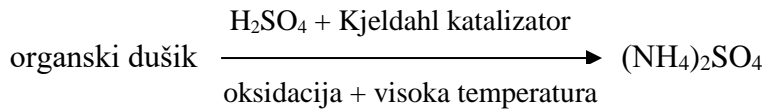
- borna kiselina 40 g L⁻¹ (priprema: iz borne kiseline, 99 – 100 %, Gram-mol d.o.o. uz dodatak 12,5 mg L⁻¹ indikatora bromkrezol-zeleno i 8,75 mg L⁻¹ indikatora metilno crvenilo)
- sumporna kiselina, 96 % (CARLO ERBA Reagents, Francuska)
- klorovodična kiselina, 0,01 mol L⁻¹ (priprema: iz klorovodične kiseline, 37 %, CARLO ERBA Reagents, Francuska)
- natrijev hidroksid, 0,01 mol L⁻¹ (priprema: iz natrijevog hidroksida, 98 %, Samago d.o.o.)
- kjeldahl tablete bez Se i Hg, 5 g tableta⁻¹ (Merck KGaA, Njemačka)

Uređaji i oprema:

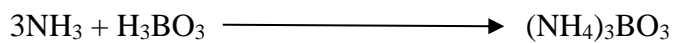
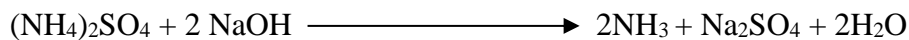
- blok za spaljivanje 1007 (Tecator, Danska)
- Kjeltex™8100 (Foss, Njemačka)
- Kjeltex kivete
- Erlenmeyerove tikvice (250 mL)

Princip određivanja :

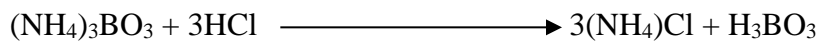
Udjel proteina određen je metodom po Kjeldahl-u. Organske tvari u uzorku se razore zagrijavanjem sa sumpornom kiselinom i pri tome dolazi do oslobađanja proteinskog i neproteinskog dušika koji zaostaje u obliku amonijevog sulfata.



U Kjeltec uređaju provodi se alkalizacija u suvišku i potom destilacija u bornu kiselinu u suvišku.



Potom se provodi titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom.



Postupak određivanja:

Uzorak i celit iz lončića su preneseni u Kjeldahlovu kivetu. U svaku kivetu je dodana jedna Kjeldahl tableta i 12 mL 96 % sumporne kiseline. Uzorak se u digestijskoj jedinici za mineralizaciju mineralizira do postizanja bistre svjetlo-zelene boje bez vidljivih crnih ostataka te su potom kivete s uzorkom ohlađene prije daljnje analize. U Erlenmeyerove tikvice dodano je 25 mL 4 % borne kiseline s indikatorima. Tikvice s bornom kiselinom i kivete sa mineraliziranim uzorcima postavljene su u Kjeltec uređaj, na kojem je destilacija provedena pri sljedećim uvjetima:

- Volumen vode: 80 mL
- Volumen lužine: 50 mL
- Vrijeme destilacije: 4 minute.

Dobiveni destilat je potom titriran klorovodičnom kiselinom koncentracije 0,01 mol L⁻¹ do promjene boje iz zelene u ružičastu. Udjel dušika izračunat je prema jednadžbi [11], gdje se postotak proteina u uzorku računa prema jednadžbi [12]:

$$\%N = \frac{\{(a-b) \times N_{kis.} \times f_{kis.} \times 1,4007\}}{m \text{ uzorak}} \quad [11]$$

gdje su:

a = volumen HCl utrošen za tritraciju uzorka [mL]

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

N = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

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

$$\% \text{ proteina} = \% N \times F \quad [12]$$

gdje je:

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

3.2.8. Ekstrakcija slobodnih bioaktivnih spojeva

Ekstrakcija je provedena prema modificiranoj *Healthgrain* metodi (Li i sur., 2009).

Kemikalije:

- etanol, 80 % (w/v) (Kefolab, Slovenija)

Uređaji i oprema:

- plastične Eppendorf epruvete (2 mL)
- mikrocentrifuga
- ultrazvučna kupelj (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Njemačka)
- vorteks
- aparatura za uparavanje tekućim dušikom
- termometar, Quartz
- električna ploča za kuhanje (Corona, Hrvatska)

Postupak određivanja:

U Eppendorf epruvete od 2 mL izvagano je po 250 mg od svakog uzorka pšeničnih posija te je dodano 1 mL 80%-tnog etanola. Epruvete s uzorcima su promiješane na vortex-u u horizontalnom položaju na 10 min. Zatim su stavljene u ultrazvučnu kupelj na sobnoj temperaturi 10 min, nakon čega su uzorci centrifugirani na mikrocentrifugi pri 8000 o min^{-1} kroz 15 min. Supernatant je dekantiran u novu epruvetu i podvrgnut procesu uparavanja tekućim dušikom na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Proces ekstrakcije ponavljen je još 2 puta uz dodatak 1 mL

etanola nakon čega su supernatanti svaki put upareni. Spojeni supernatanti su čuvani u zamrzivaču na -18 °C do analize.

3.2.9. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određen je prema modificiranoj metodi Gao i sur. (2002).

Kemikalije:

- Folin – Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- natrijev karbonat (Na_2CO_3), 20%-tna otopina (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 800 mL vruće destilirane vode, u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL, a zatim ohladi na sobnu temperaturu te nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina treba odstajati 24 h te se nakon toga profiltrira.)
- galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, SAD)

Uređaji i oprema:

- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- mikropipete (10-100 μL i 100-1000 μL)
- spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)

Princip određivanja:

Ova metoda određivanja udjela ukupnih polifenola temelji se na reakciji prijenosa elektrona između Folin-Ciocalteu reagensa i nekog reducirajućeg reagensa, u ovom slučaju fenola, pri čemu dolazi do promjene boje reakcijske smjese. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolidbene i fosfovolframove kiseline koja prima elektrone od fenolnih komponenata iz uzorka pri čemu se Folin-Ciocalteu reagens reducira i nastaju plavo obojeni molidbenov i volframov oksid. Intezitet plavog obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 765 nm pri čemu je intezitet obojenja proporcionalan udjelu polifenolih spojeva u ispitivanom uzorku.

Postupak određivanja:

Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom slobodnih spojeva otopljeni su u 200 μL metanola te je otpipetirano 15 μL u kivete za spektrofotometrijsko mjerenje, dodano se 400 μL destilirane

vode, te 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodano je 300 μL 20 %-tne otopine natrijevog karbonata (Na_2CO_3) te 1180 μL destilirane vode. Reakcijska smjesa u kivetama se dobro promiješala te su pripremljeni uzorci ostavljeni stajati 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega se mjerila apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm, u odnosu na slijepu probu. U slijepu probu se umjesto 20 μL uzorka stavljalo 20 μL metanola. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjel ukupnih polifenola izračunat je iz jednadžbe baždarne krivulje:

$$y = 1,2048 x + 0,1266$$

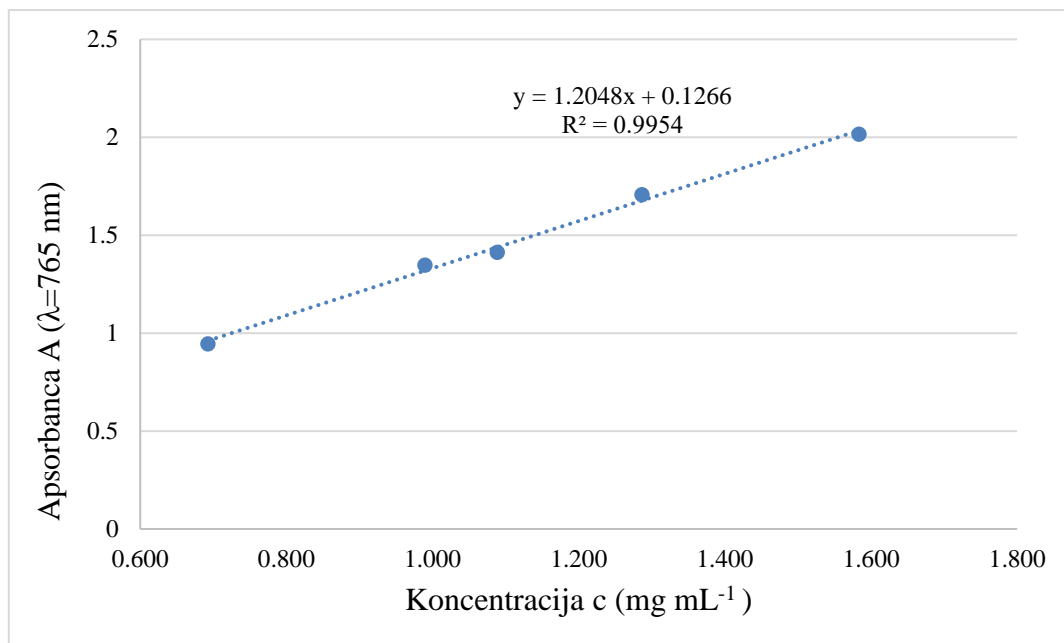
$$R^2 = 0,9954$$

gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje, konstruirane za standard galne kiseline, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg L^{-1}), određen je udjel ukupnih polifenola u ispitivanom uzorku. Određivanje udjela ukupnih polifenola provedeno je u 3 paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama, u mg ekvivalentima galne kiseline (EGK) /g s. tv. uzorka. Za izradu baždarnog pravca (Slika 2) pripremljena je otopina galne kiseline u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 2. Baždarna krivulja za TPC

3.2.10. Određivanje aktivnosti polifenol-oksidadze

Za određivanje aktivnosti polifenol-oksidadze korištena je modificirana AACC metoda 22-85.01 (2000).

Kemikalije:

- 3-(*N*- morfolino) propansulfonska kiselina (MOPS), pH 6,5 (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) 10 mM (Acros Organics, New Jersey, SAD) (Priprema: otopi se 98,5 mg L-DOPA-e u 50 mL MOPS-a pH 6,5 s dodatkom 0,02% (v/v) Tween 20)
- polioksietilen sorbitan monolaurat (Tween 20) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Uređaji i oprema:

- plastične Eppendorf epruvete za mikrocentrifugu (2 mL)
- vorteks
- spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- analitička vaga ALS220-4N (Kern, Njemačka)

- automatske propipete od 1 mL i 20 μ L
- pH metar, JENWAY 3510 (UK)
- štoperica

Postupak određivanja:

U Eppendorf epruvete odvagano je $50,0000 \pm 0,0030$ mg svakog uzorka pšeničnih posija i dodano 1,5 mL pripremljene L-DOPA otopine, dok je u kontrolni uzorak dodano samo 1,5 mL L-DOPA otopine. Uzorci su zatim stavljeni na miješanje na vorteks u trajanju od 55 min nakon čega slijedi mikrocentrifugiranje na 5 min. 1 mL svakog uzorka prebacuje se u mikrokivete i mjeri se apsorbancija na 475 nm.

3.2.11. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Određivanje antioksidacijskog kapaciteta polifenolnih spojeva provedeno je korištenjem DPPH (1,1 - difenil - 2 - pikrilhidrazil) i FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode. DPPH i FRAP antioksidacijska aktivnost određena je prema modificiranoj metodi Belščak i sur. (2009).

3.2.11.1. FRAP metoda

Kemikalije:

- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM (Kemika, Zagreb, Hrvatska) (Priprema: 0,0541 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ se otopi u 10 mL destilirane vode.)
- TPTZ (2,4,6 – Tris(2-piridil)-s-triazin), 10 mM (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Njemačka) (Priprema: 0,0312 g TPTZ-a otopi se u 10 mL 40 mM HCl.)
- acetatni pufer, 300 mM (Lach-Ner, Neratovice, Češka) (Priprema: 0,93 g bezvodnog natrij acetata ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) otopi se u 8 mL ledene octene kiseline (99,5 %, Macron, Center Valley, SAD) i nadopuni destiliranom vodom do oznake od 500 mL.)
- Trolox (6 - hidroksi - 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Uređaji i oprema:

- mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- mikropipete volumena 10 - 100 μ L i 100 - 1000 μ L

- spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- pipete (5 mL i 20 mL)
- analitička vaga, ALS220-4N, Kern (Balingen, Njemačka)
- štoperica

Princip određivanja:

Ova metoda koristi antioksidanse kao reduktante koji doniraju elektron željezovom (III) oksidu (žuto obojen) te on prelazi u željezov (II) oksid (plavo obojen) pri čemu je intenzitet obojenja proporcionalan redukcijskoj snazi antioksidansa. Reakcija se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 593 nm.

Postupak određivanja:

Pripremljen je FRAP reagens tako da se 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mL 10 mM TPTZ u 40 mM HCl i 25 mL 300 mM acetatnog pufera pomiješaju i mješavina zagrije na 37 °C. U mikrokivete je dodavano po 20 μL ekstrakta posija i 1 mL FRAP reagensa, a u 2 kontrolna uzorka umjesto ekstrakta posija stavljeno je 20 μL metanola te je mjerena 4-minutna reakcija u mraku nakon čega je izmjerena apsorbancija na 593 nm.

Jednadžba baždarne krivulje:

$$y = 3,0892 x + 0,0136$$

$$R^2 = 0,9952$$

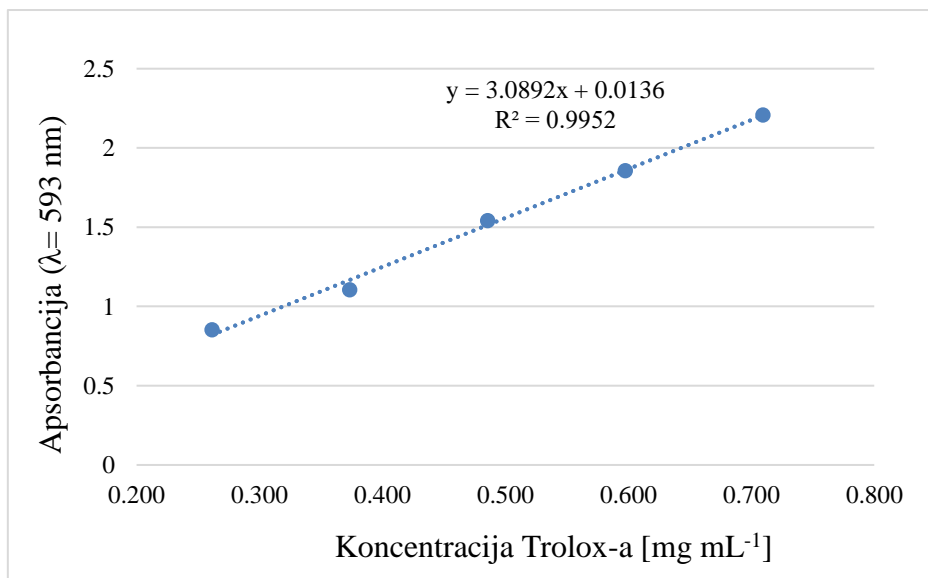
gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm

Iz jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a, koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda (mg mL^{-1}), određena je antioksidacijska aktivnost u ispitivanom uzorku. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom provedeno je u tri paralelene probe ($n = 3$), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti provedenih mjerenja s pripadajućim standardnim devijacijama u μmol Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.

Za izradu baždarnog pravca (Slika 3) pripremljena je otopina Trolox-a (6 – hidroks i- 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 3. Baždarna krivulja za FRAP

3.2.11.2. DPPH metoda

Kemikalije:

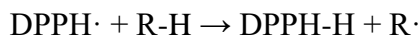
- DPPH (2,2 – difenil - pikrilhidrazil), 0,06 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) (Priprema: 0,00236 g DPPH otopi se u odmjernoj tikvici od 100 mL s metanolom i nadopuni do oznake.)
- metanol, apsolutni, HPLC čistoće (Avantor Performance Materials B.V., Arnhem, Nizozemska)
- Trolox (6 - hidroksi - 2, 5, 7, 8 tetrametilkroman - 2 - karbonska kiselina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)

Uređaji i oprema:

- spektrofotometar (PERKIN ELMER Lambda UV/Vis/NIR, Waltham, Massachusetts, SAD)
- mikrokivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- analitička vaga ALS220-4N (Kern, Njemačka)
- mikropipete (10 – 100 μL i 100 – 1000 μL)

Princip određivanja:

Ova metoda se temelji na teoriji da je antioksidans donor vodika te tako hvata slobodne radikale. Dolje prikazan mehanizam reakcije pokazuje kako antioksidans donira vodik DPPH· i on prelazi u DPPH-H pri čemu dolazi do promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu. Antioksidacijski učinak ili postotak vezanja slobodnih radikala proporcionalan je nestanku DPPH· u uzorcima. Reakcija se mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini od 517 nm.



Postupak određivanja:

Otpipetiralo se 20 μL uzorka ekstrakta pšeničnih posija u mikrokivetu te se dodalo 950 μL pripremljene 0,06 mM otopine 2,2 – difenil – pikrilhidrazil radikala (DPPH) i nakon 30 min stajanja u mraku izmjerila se apsorbancija na 517 nm. Mjerenja se se izvodila u 3 paralele, u usporedbi sa slijepom probom u koju se umjesto ekstrakta posija stavilo 20 μL metanola.

Izračunom %-tka vezanih radikala dobila se vrijednost ΔA , koja se pomoću jednadžbe baždarne krivulje konstruirane za standard Trolox-a preračunala u koncentraciju (mmol Trolox-a).

Jednadžba baždarne krivulje:

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

$$R^2 = 0,9934$$

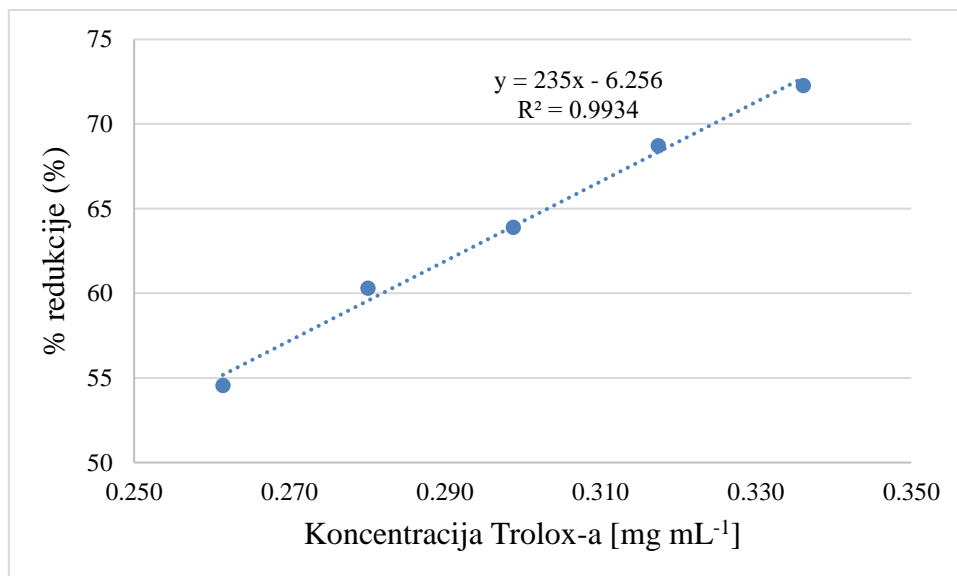
gdje su:

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

y – izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 517 nm.

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

Za izradu baždarnog pravca (Slika 4) pripremljena je otopina Trolox-a (6-hidroksi- 2,5,7,8 tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u metanolu u pet različitih koncentracija.



Slika 4. Baždarna krivulja za DPPH

3.2.12. Određivanje boje

Boja je određivana prema CIE, 2004.

Uređaji i oprema:

- spektrofotometar CM-3500D (Konica – Minolta, Japan)
- set za mjerenje praškastih materijala (Petri Dish Set, CM-A126) koji uključuje Petrijevu zdjelicu promjera 30 mm, masku za prolaz svjetlosti promjera otvora 30 mm i kalibracijsko staklo za Petrijevu zdjelicu promjera 30 mm

Princip određivanja:

CM-3500D spektrofotometar je višenamjenski uređaj koji može mjeriti boju u širokom rasponu primjena, uključujući prijenos i refleksiju. Ovaj uređaj nudi tri izmjenjive veličine mjernih otvora (3mm, 8mm i 30mm); izbor ovisi o primjeni. Radno područje uređaja je između 400 i 700 nm. CM-3500D je kompatibilan sa SpectraMagic NX softverom. Uređaj mjeri a^* , b^* i L^* parametre. L^* parametar je mjera svjetline/bjeline koja ima vrijednosti od 0 do 100 (bijelo ako je $L^* = 100$, crno ako je $L^* = 0$), a^* je indikator crvenila i varira od $-a^*$ do $+a^*$ ($-a^*$ = zeleno, $+a^*$ = crveno), dok je b^* mjera žutila koja također varira iz minusa u plus, od $-b^*$ za plavu do $+b^*$ za žutu.

Postupak određivanja:

Pšenične posije su stavljene u Petrijeve zdjelice promjera 30 mm do polovice visine Petrijeve zdjelice tako da dno bude u potpunosti prekriveno posijama. Zdjelica je položena na otvor iz kojeg dolazi svjetlo i poklopljena s poklopcem te je pomoću softvera pokrenuto mjerenje vrijednosti a^* , b^* i L^* . Prema tim vrijednostima izračuna se ukupna razlika obojenosti između tretiranih uzoraka. Uzorci su mjereni u triplikatu ($n = 3$).

3.2.13. Određivanje kapaciteta zadržavanja vode

Kapacitet zadržavanja vode određen je prema AACC 56-11.02 metodi.

Uređaji i oprema:

- Falcon plastične epruvete (50 mL)
- stakleni sinter lončić G4 (Boral, Hrvatska)
- odsisna boca
- adapter za sinter lončić
- eksikator sa silikagelom
- centrifuga Rotina 35 (Hetich, Njemačka)
- sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)

Postupak određivanja:

Izvagano je $1,0000 \pm 0,0001$ g uzorka u plastične epruvete volumena 50 ml. Uzorcima je dodano 30 mL vode te su ostavljeni 18 h na sobnoj temperaturi. Nakon 18 h hidratacije uzorci su centrifugirani pri $3000 \times g$ tijekom 20 min i profiltrirani uz vakuum kroz prethodno osušeni i izvagani stakleni sinter lončić G4. Hidratizirani ostatak na lončiću je izvagano i stavljen na sušenje na 105°C tijekom 2 h. Nakon sušenja izvagano je suhi ostatak na lončiću. Kapacitet zadržavanja vode izračunat je prema jednadžbi [12]:

$$\text{WRC (g/g)} = \frac{\text{masa hidratiziranog uzorka} - \text{masa osušenog uzorka}}{\text{masa osušenog uzorka}} \quad [13]$$

gdje je:

WRC (engl. Water Retention Capacity – hrv. kapacitet zadržavanja vode)

3.2.14. Bubrenje

Sposobnost bubrenja u vodi određena je prema metodi Raghavendre i sur. (2004).

Uređaji i oprema:

- menzure (10 mL)
- analitička vaga, ALS220-4N, Kern (Balingen, Njemačka)
- stakleni ljevak
- automatska propipeta (5 mL)

Postupak određivanja:

U menzure od 10 mL izvagano je $200,0 \pm 0,2$ mg uzorka pšeničnih posija i dodano 10 ml vode. Natopljeni uzorci ostavljeni su da se hidratiziraju 18 h nakon čega je očitavan volumen taloga. Bubrenje [mL mg^{-1}] izračunat je prema jednadžbi [14]:

$$\text{bubrenje} = \frac{\text{volumen taloga}}{\text{masa uzorka}} \quad [14]$$

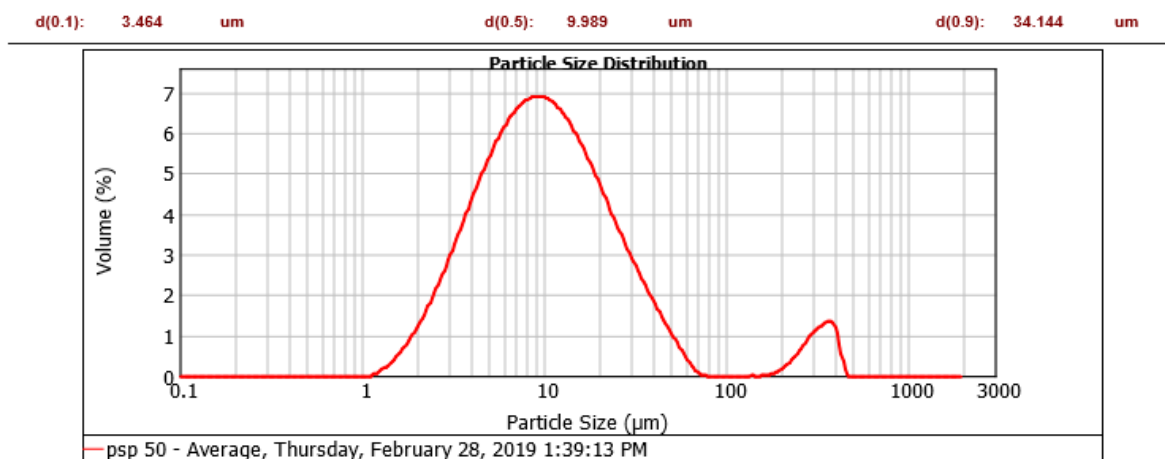
3.3. Statistička obrada rezultata

Rezultati su obrađeni i grafički prikazani pomoću programa Excel 2010. Statistička analiza napravljena je u programu Statistica 10 (Stat Soft Inc., SAD) Primijenjeni su testovi analiza varijance (ANOVA) i Tukey test, uz razinu statističke značajnosti $p = 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu ispitan je utjecaj tretmana ultrazvukom visokog intenziteta različitih vremena trajanja i amplitude na sadržaj ukupnih polifenola, aktivnost polifenol-oksidge, antioksidacijsku aktivnost, kapacitet zadržavanja vode, bubrenje i boju ultra-fino mljevenih pšeničnih posija. Osim toga, određena je raspodjela veličine čestica, udjel netopljivih vlakana (IDF), topljivih vlakana velike molekulske mase (SDFP) i topljivih vlakana male molekulske mase (SDFS) u uzorcima pšeničnih posija čestica manjih od 50 μm dobivenih kriomljevenjem.

4.1. Utjecaj kriomljevenja na raspodjelu veličine čestica pšeničnih posija



Slika 5. Raspodjela veličine čestica pšeničnih posija nakon kriomljevenja i prosijavanja na veličinu $< 50 \mu\text{m}$. Na x-osi nalazi se veličina čestica (μm), a na y-osi volumni udio (%).

Iz dobivene krivulje raspodjele veličine čestica (Slika 5) vidljivo je da najveći volumni udio čestica pšeničnih posija nakon kriomljevenja i prosijavanja na veličinu $< 50 \mu\text{m}$ čine čestice veličine $\sim 10 \mu\text{m}$.

4.2. Sadržaj vlakana

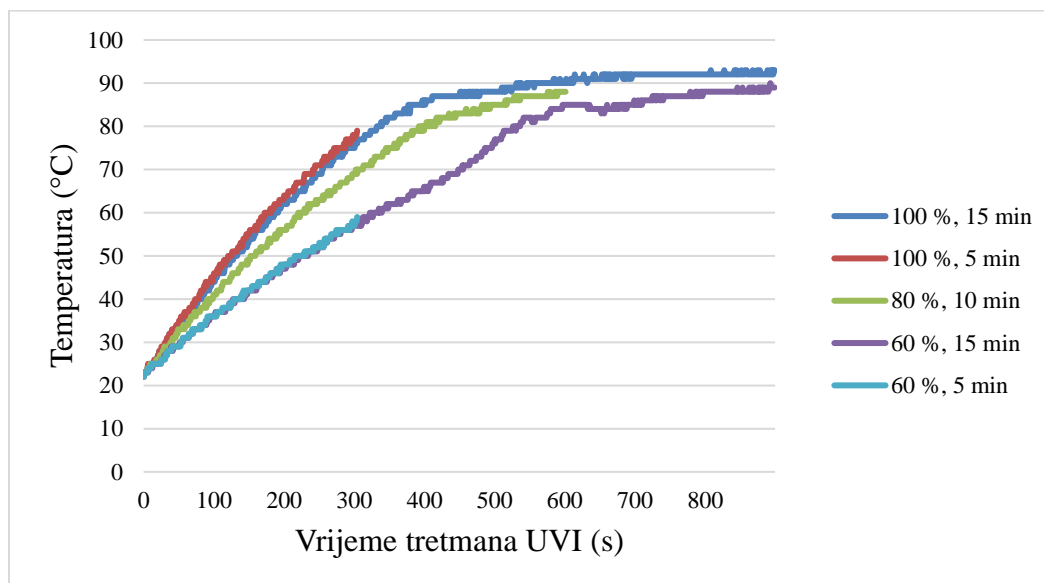
Udio prehrambenih vlakana u mljevenim pšeničnim posijama naveden je u Tablici 4. Ukupan udio vlakana iznosi 33,03 %, od čega najveći dio čine netopljiva IDF vlakna (76,42 %). Posije su bogate vlaknima jer ih ima više od 6 g u 100 g, a pošto je udio topljivih vlakana veći od 10 % to ih čini pogodnima za obogaćivanje hrane vlaknima.

Tablica 4. Sadržaj vlakana u pšeničnim posijama čestica manjih od 50 μm

Uzorak	Udio IDF na suhu tvar uzorka (%)	Udio SDFP na suhu tvar uzorka (%)	Udio SDFS na suhu tvar uzorka (%)
pšenične posije < 50 μm	25,24 \pm 2,34	4,48 \pm 0,95	3,31 \pm 0,19

4.3. Kinetika promjene temperature tijekom tretmana UVI

Tijekom ultrazvučnog tretmana dolazi i do promjene temperature koja također može imati utjecaj na rezultate navedene u poglavljima 4.3.-4.7. Na Slici 6 može se uočiti kako pri različitim jačinama amplituda i vremenima trajanja ultrazvučnog tretmana uzorci prolaze i kroz različite temperaturne režime pri čemu svi počinju od iste sobne temperature, a završavaju na različitim, ovisno o uvjetima tretiranja. U narednim poglavljima je komentiran i ovaj mogući utjecaj.



Slika 6. Kinetika promjene temperature tijekom tretmana UVI.

4.4. Utjecaj UVI na hidrationska svojstva

Nakon provedenog tretmana UVI i liofilizacije uzoraka, provedeno je ispitivanje sposobnosti bubrenja u vodi, kapaciteta zadržavanja vode i udjela vode tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu. U Tablici 5 prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 5. Sposobnost bubrenja u vodi, kapacitet zadržavanja vode i udio vlage ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju paralelnih proba ($n = 3$) u odnosu na kontrolni uzorak.

Uzorak	Sposobnost bubrenja u vodi (mL g^{-1} s.t.)	Kapacitet zadržavanja vode (g g^{-1} s.t.)	Udio vlage ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)
1+2	$5,55 \pm 0,88$	$5,60 \pm 1.37$	$3,07 \pm 0,05$
3+4	$6,69 \pm 0,35$	$6,98 \pm 0.52$	$2,79 \pm 0,04$
5+6	$7,07 \pm 0,18$	$8,66 \pm 0.58$	$2,84 \pm 0,08$
7+8	$4,88 \pm 0,35$	$6,27 \pm 1.38$	$2,55 \pm 0,04$
9+10	$5,91 \pm 1,05$	$8,15 \pm 0.48$	$2,66 \pm 0,09$
NULA	$4,50 \pm 0,18$	$5,02 \pm 0.99$	$2,62 \pm 0,22$

Iz dobivenih rezultata u Tablici 5 proizlazi da tretman UVI povećava sposobnost bubrenja u vodi i kapacitet zadržavanja vode. Sposobnost bubrenja i kapacitet zadržavanja vode najveći su kod uzorka tretiranog 80%-tnom amplitudom kroz 10 min. Rezultati se mogu povezati s radom Hu i sur., (2015) koji su proučavali utjecaj homogenizacije i ultrazvuka visokog inteziteta na fizikalna svojstva netopljivih vlakana pšeničnih posija pri čemu su uočili da dolazi do veće snage bubrenja i sposobnosti zadržavanja vode. Može se pretpostaviti da je djelovanjem UVI došlo do pucanja i/ili preraspodjele kemijskih veza između gradivnih molekula prehrambenih vlakana što je omogućilo bolju apsorpciju vode, ali isto tako sile smicanja koje nastaju tijekom tretmana UVI mogu uzrokovati kolaps matrice vlakana i pora, što može negativno utjecati na hidratacijska svojstva vlaknastih materijala. Općenito se sposobnost vlakana da vežu vodu odnosi se na njihovu strukturu, gustoću, prirodu i broj mjesta vezanja vode. Tada se očekuje da će smanjena veličina čestica nastala kriogenim mljevenjem i tretmanom UVI uvelike povećati površinu i izložiti više mjesta za vezanje vode (npr. polarne skupine) u okolnu vodu (Chen i sur., 2013), što dovodi do značajnog poboljšanja u bubrenju i kapacitetu zadržavanja vode (Chau i sur., 2007). Dobiveni rezultati mogu se povezati i s istraživanjem Manchun i sur., (2012) koji su promatrali utjecaj ultrazvučnog tretmana na fizikalna svojstva škroba tapioke. Ultrazvučno tretirani škrob imao je veću snagu bubrenja u usporedbi s prirodnim i toplinski obrađenim škrobovima pri čemu je povećana sposobnost upijanja vode koja nastaje kao rezultat ultrazvučnog poremećaja granula škroba povezana s nastankom većeg broja mjesta za ulaz vode u škrobne granule što dovodi do većeg unosa vode. Najveći utjecaj na dezintegraciju škrobnih granula imaju kavitacijske sile koje

moгу razbiti kristalnu molekularnu strukturu i lance tapiokinog škroba prekidanjem kovalentnih veza. Stoga se molekule vode mogu vezati više za slobodne hidroksilne skupine amiloze i amilopektina vodikovim vezama, koji uzrokuju povećanje snage bubrenja. Potrebno je provesti daljnja istraživanja na ovom području s obzirom da se postavlja pitanje bi li veće vezanje vode dodatkom pšeničnih posija tretiranih UVI prilikom proizvodnje pekarskih proizvoda omogućilo postizanje optimalne elastičnosti tijesta ili bi apsorpcija velike količine vode negativno utjecala na razvoj strukture tijesta.

4.5. Utjecaj tretmana UVI na boju

Pšenične posije zbog svoje tamne boje narušavaju boju proizvoda u koje se dodaju što odbija potrošače pa se stoga nastoji pronaći način kako umanjiti taj negativni efekt. Parametri boje koji su određivani prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. L^* , a^* i b^* parametri boje pšeničnih posija nakon tretmana UVI u usporedbi s kontrolom (NULA). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija triju paralelnih proba ($n = 3$) u odnosu na kontrolni uzorak.

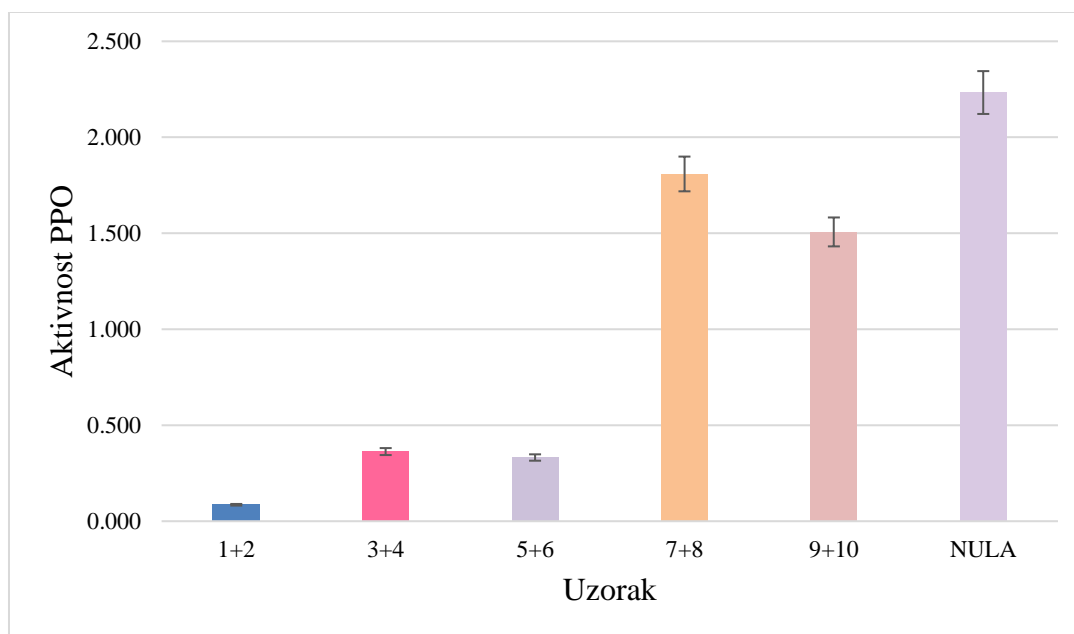
Uzorak	L^*	a^*	b^*
1+2	$58,71 \pm 0,02$	$7,00 \pm 0,02$	$22,22 \pm 0,19$
3+4	$59,26 \pm 0,82$	$7,01 \pm 0,17$	$22,36 \pm 0,26$
5+6	$58,67 \pm 0,93$	$7,60 \pm 0,17$	$22,38 \pm 0,28$
7+8	$61,54 \pm 0,18$	$7,83 \pm 0,04$	$22,12 \pm 0,10$
9+10	$55,40 \pm 0,37$	$9,23 \pm 0,14$	$22,94 \pm 0,04$
NULA	$64 \pm 0,29$	$6,71 \pm 0,09$	$21,80 \pm 0,19$

Iz dobivenih rezultata u Tablici 6 može se uočiti da je kod svih uzoraka tretiranih ultrazvukom visokog inteziteta manja svjetlina (L^*) u odnosu na kontrolni uzorak, a najmanje smanjenje svjetline pokazuje uzorak tretiran najmanjom amplitudom u najkraćem vremenu (7+8). To daje za zaključiti kako tretman UVI utječe na svjetlinu pšeničnih posija pri čemu i amplituda i vrijeme trajanja tretmana imaju bitan učinak što je i potvrđeno ANOVA testom ($p < 0,05$). Parametar a^* koji predstavlja indikator crvenila je veći kod tretiranih uzoraka pri čemu najveću a^* vrijednost pokazuje uzorak tretiran najvećom amplitudom u najkraćem vremenu (9+10). Sukladno tome i amplituda i vrijeme tretiranja utječu na a^* parametar što je i potvrđeno ANOVA testom ($p < 0,05$) pri čemu će a^* biti veći ako je amplituda veća, a

vrijeme tretiranja kraće. Parametar b^* također pokazuje veće vrijednosti kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu pri čemu uzorak 9+10 ima najveću vrijednost. ANOVA testom je uočeno da na b^* parametar koji predstavlja mjeru žutila više utječe vrijeme tretiranja nego jačina amplitude ($p < 0,05$). Kod proizvoda od pšeničnih posija poželjna je što veća svjetlina i što veći a^* i b^* parametri jer se crvena i žuta boja smatraju privlačnijima kada se radi o prehrambenim proizvodima. S obzirom da nema dosadašnjih istraživanja o ovom utjecaju, na temelju ovih rezultata može se zaključiti kako tretman UVI povoljno djeluje na boju pšeničnih posija te je poželjno daljne istraživanje u tome smjeru.

4.6. Utjecaj tretmana UVI na aktivnost polifenol-oksidge

Ispitivanim uzorcima spektrofotometrijski je određena aktivnost PPO. Dobivene vrijednosti uzoraka tretiranih UVI uspoređene su s vrijednošću aktivnosti PPO kontrolnog uzorka (NULA) (Slika 7).

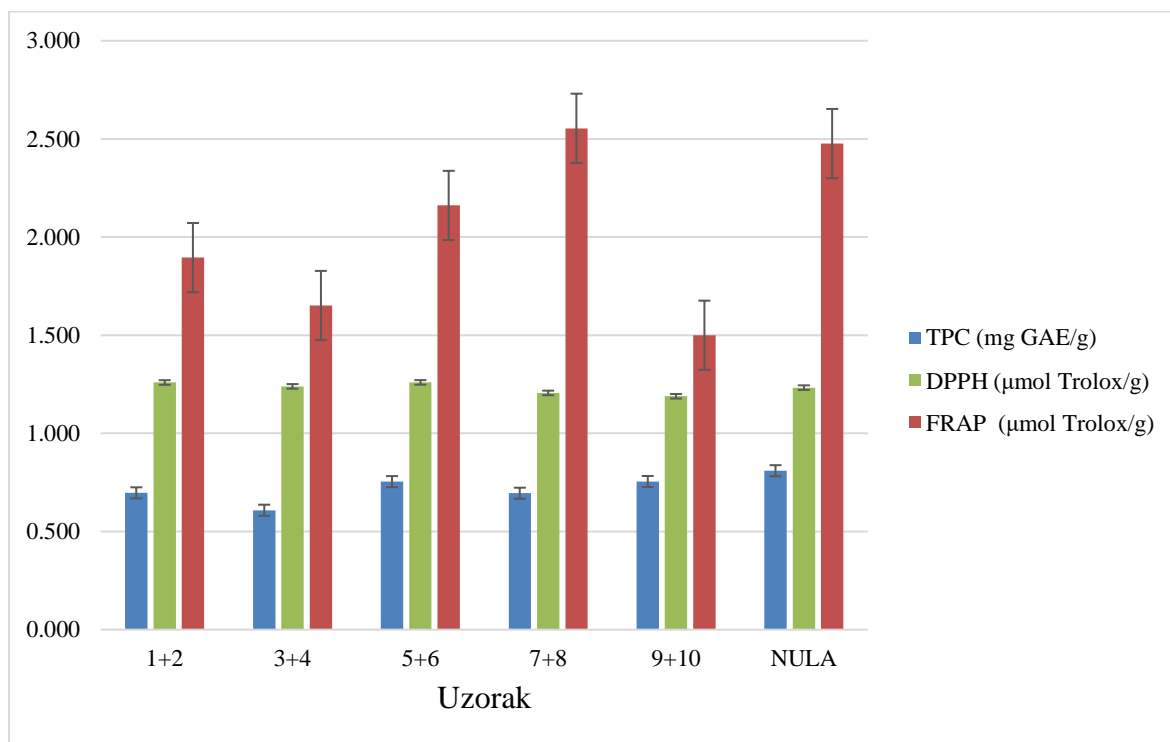


Slika 7. Aktivnost PPO ovisno o tretmanu UVI u usporedbi sa kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 3$) na 100 mg suhe tvari uzorka.

Iz dobivenih rezultata na Slici 7 može se zaključiti da tretman ultrazvukom visokog inteziteta dovodi do smanjenja aktivnosti PPO kod svih uzoraka. Najviše izraženo smanjenje aktivnosti PPO uočeno je kod uzorka tretiranog amplitudom 100% u trajanju od 15 min (uzorak 1+2), a najmanje kod uzorka tretiranog amplitudom 60% u trajanju od 5 min (uzorak 5+6). To ističe da na aktivnost PPO jednako bitno utječu i amplituda i vrijeme trajanja tretmana UVI što je potvrđeno i ANOVA testom ($p < 0,05$) (Tablica 7). Dobiveni rezultati u skladu su s

rezultatima Liu i sur. (2016) koji su pokazali da tretman UVI uzrokuje smanjenje aktivnosti PPO kod slatke dinje što se pripisuje nastalim konformacijskim promjenama u strukturi pri čemu dolazi do inaktivacije enzima. Glavni mehanizmi kojima se smatra da dolazi do inaktivacije enzima su kavitacija, lokalizirano zagrijavanje i stvaranje slobodnih radikala. Kavitacija se događa kada ultrazvuk prolazi kroz tekući medij, uzrokujući alternativno razrijeđivanje (negativni tlak) i kompresiju (pozitivni tlak). Ako su ultrazvučni valovi dovoljno velike amplitude, tada nastaju mjehurići koji eksplodiraju različitim intenzitetima i smatra se da je to glavni doprinos staničnom poremećaju. Mehanizmi uključeni u stanični poremećaj mogu uključivati silu smicanja tijekom pokreta (subcelularna turbulencija) mjehurića ili iznenadne lokalizacije temperature (5000 K) i tlaka (50 MPa) uzrokovane kolapsom mjehurića (Leadley i Williams, 2006). Ultrazvuk također uzrokuje razgradnju vode unutar oscilatornih mjehurića pri čemu nastaju H^+ i OH^- slobodni radikali koji mogu vezati neke aminokiselinske ostatke enzima narušavajući tako stabilnost strukture, vezanje supstrata ili katalitičke funkcije enzima (Lopez i sur., 1994). Pod tim ekstremnim uvjetima, ultrazvuk može uzrokovati pucanje vodikovih veza i van der Waalsove interakcija u polipeptidnim lancima, vodeći do modifikacije sekundarne i tercijarne strukture proteina. S takvim promjenama u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina, enzim obično gubi svoju biološku aktivnost (Mawson i sur., 2010). Baltacıoğlu i sur. (2013) također su istraživali učinak ultrazvuka na aktivnost PPO u gljivama u usporedbi s termičkom obradom pri čemu se termosonizacija (na 25 kHz i na 55-75 ° C) pokazala se učinkovitijim načinom inaktiviranja PPO u odnosu na termičku obradu, a Jang i Moon (2011) su kombinacijom ultrazvuka i askorbinske kiseline uspjeli inaktivirati PPO kod svježe rezanih jabuka. Uzimajući u obzir dobivene rezultate može se zaključiti da primjena ultrazvuka visokog inteziteta predstavlja obećavajuću tehnologiju u inaktivaciji enzima za proizvodnju hrane poboljšanih svojstava ne narušavajući pritom kvalitetu hrane kao termička obrada na visokim temperaturama.

4.7. Utjecaj tretmana UVI na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet pšeničnih posija



Slika 8. Sadržaj ukupnih slobodnih fenolnih spojeva (TPC) i antioksidacijski kapacitet kriogeno mljevenih i ultrazvukom visokog inteziteta tretiranih pšeničnih posija određen DPPH i FRAP metodom. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije ($n = 3$) u odnosu na kontrolni uzorak (NULA), u mg ekvivalentima galne kiseline (GAE) g^{-1} s. tv. uzorka za TPC te $\mu\text{mol Trolox } g^{-1}$ s.tv. uzorka za DPPH i FRAP.

Iz dobivenih rezultata na Slici 8 može se uočiti da je ukupan sadržaj slobodnih fenolnih spojeva manji kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu je najmanji kod uzorka tretiranog najmanjom jačinom amplitude (60 %) najduže vremena (15 min) (3+4), a najveći kod uzorka tretiranog najjačom amplitudom (100 %) najkraće vremena (5 min) (9+10). Provedena ANOVA pokazala je da na TPC više utječe jačina amplitude nego vrijeme tretiranja uzorka ($p < 0,05$) (Tablica 7). Dobiveni rezultati mogu se povezati s rezultatima Sun i sur., (2015) koji su zaključili da tretman ultrazvukom dovodi do smanjenja ukupnog sadržaja fenolnih spojeva kod svježeg soka od jabuke što može biti rezultat djelovanja slobodnih radikala nastalih ultrazvukom. No, u literaturi ima i drugačijih rezultata. Bhat i sur. (2011) izvijestili su da sonifikacija soka limete pokazuje povećanje u sadržaju fenolnih spojeva, dok su Caminiti i sur. (2011) ustanovili da ultrazvuk nije utjecao na sadržaj ukupnih fenola u mješavini soka od jabuke i brusnice. Tiwari i sur. (2008) izvijestili su da se sadržaj antocijana

u soku jagode povećao pri niskim intenzitetima ultrazvuka i razgradio pri visokim ultrazvučnim intenzitetima. Još jedan faktor koji može utjecati na dobivene rezultate je kinetika promjene temperature tijekom tretmana UVI. Iz Slike 6 može se vidjeti kako su ta dva uzorka tijekom tretmana bila na različitim temperaturama pri čemu je uzorak 9+10 bio kraće vremena na višim temperaturama, a uzorak 3+4 duže vremena na nižim temperaturama. Ako izuzmemo duljinu vremena tretiranja i oba uzorka promatramo samo u periodu od 5 min vidljivo je da krivulja uzorka 9+10 ima veći nagib jer je taj uzorak u kraćem vremenu postigao višu temperaturu od uzorka 3+4 te je stoga moguće da i temperatura tijekom tretiranja utječe na ukupan sadržaj fenolnih spojeva.

Vrijednosti dobivene za antioksidacijski kapacitet mjeran DPPH metodom na Slici 8 su veoma slične te nije došlo do značajnih promjena u odnosu na kontrolni uzorak. Najmanju vrijednost pokazuje uzorak 9+10 koji je tretiran 100%-tnom amplitudom kroz 5 min, a najveću uzorak 5+6 tretiran 80%-tnom amplitudom kroz 10 min. Pomoću ANOVA-e ustanovljeno je da na dobivene vrijednosti veći utjecaj ima vrijeme nego amplituda tretmana ($p < 0,05$) (Tablica 7). Rezultati se poklapaju s rezultatima Braje (2017) koja navodi da ultrazvučni tretman nije imao utjecaj na DPPH antioksidacijsku aktivnost ekstrakta prosa u odnosu na netretirani uzorak. U literaturi se nalaze oprečni rezultati. Zou i Hou (2017) izvijestili su da sonifikacija povećava DPPH u soku od borovnice pri čemu je uočena pozitivna i značajna korelacija između ukupnih fenolnih spojeva i vrijednosti DPPH aktivnosti. S povećanjem trajanja sonifikacije više se antioksidanasa moglo osloboditi te je stoga više slobodnih radikala mogao biti uklonjeno. To je jedna od najvažnijih prednosti ultrazvuka. S druge strane, Braje (2017) navodi da ultrazvuk visokog intenziteta ima negativan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost bučine pogače izmjerenu DPPH metodom. Sa stajališta kinetike promjene temperature, krivulja uzorka 9+10 ima veći nagib nego krivulja uzorka 5+6 (Slika 6) što može davati naznake da brži porast temperature tretiranja dovodi do gubitka antioksidacijske aktivnosti.

Rezultati za antioksidacijski kapacitet određivan FRAP metodom na Slici 8 također ne pokazuju pravilnost jer kao što se može uočiti na Slici 8 neke vrijednosti su veće, a neke manje u odnosu na kontrolu. Kao i kod DPPH, uzorak 9+10 pokazuje najmanju vrijednost, a uzorak 7+8 tretiran 60%-tnom amplitudom kroz 5 min pokazuje najveću vrijednost. ANOVA testom pokazalo se da na dobivene vrijednosti veći utjecaj ima amplituda nego samo vrijeme tretiranja ($p < 0,05$) (Tablica 7). Braje (2017) ističe kako djelovanje UVI na mljevenu heljdu i proso povećava FRAP antioksidacijsku aktivnost, a na bučinu pogaču smanjuje. Kao i kod DPPH metode, krivulja promjene temperature uzorka s najmanjim antioksidacijskim

kapacitetom ima također veći nagib (Slika 6) i tu je stoga isto uočljivo da se zbog bržeg postizanja viših temperatura tijekom tretiranja dolazi do gubitka antioksidacijske aktivnosti.

Tablica 7. Utjecaj amplitude i vremena tretiranja na dobivene vrijednosti mjerene metodama TPC, FRAP, DPPH i PPO izražene kao p-vrijednost. p-vrijednosti označene zvjezdicom se smatraju utjecajnim ($p < 0,05$).

Metoda	Amplituda (%)	Vrijeme (min)
TPC	0,004*	0,065
FRAP	0,010*	0,207
DPPH	0,602	0,002*
PPO	< 0,001*	< 0,001*

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u sklopu ovog istraživanja i provede rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ultrazvuk visokog inteziteta dovodi do smanjenja aktivnosti PPO pri čemu jednako bitno utječu i amplituda i vrijeme trajanja tretmana UVI. Smanjenje aktivnosti pripisuje se nastalim konformacijskim promjenama prilikom djelovanja UVI pri čemu dolazi do inaktivacije enzima.
2. Tretman UVI ne utječe značajno na sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kao ni na antioksidacijsku aktivnost određivanu DPPH i FRAP metodom. Vrijednosti dobivene mogu se pripisati kinetici promjene temperature pri čemu brzi porast temperature tijekom tretmana dovodi do blagog smanjenja sadržaja fenolnih spojeva kao i do gubitka antioksidacijske aktivnosti.
3. Ultrazvuk visokog inteziteta povećava sposobnost bubrenja i kapacitet zadržavanja vode ultra-fino mljevenih pšeničnih posija u odnosu na netretirani uzorak pri čemu su najveće vrijednosti postignute kod tretmana 80%-tnom amplitudom kroz 10 minuta.
4. Tretman ultrazvukom visokog inteziteta dovodi dopromjene boje posija i to smanjenja L^* vrijednosti u odnosu na neobrađeni uzorak pri čemu značajan utjecaj imaju i vrijeme tretiranja i jačina amplitude, dok a^* i b^* parametri boje pokazuju veće vrijednosti pri čemu na a^* značajan utjecaj imaju i jačina amplitude i vrijeme tretiranja, a na b^* samo vrijeme tretiranja.
5. Ultrazvuk visokog inteziteta predstavlja obećavajuću tehnologiju obrade pšeničnih posija zbog inaktivacije PPO čime se povećava stabilnost i smanjuje nepoželjno tamnjenje proizvoda pri čemu ne dolazi do značajnog smanjenja sadržaja fenolnih spojeva niti antioksidacijske aktivnosti.

6. LITERATURA

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

AACC International Method 56-11.02 Solvent Retention Capacity Profile

Albers, S., Muchová, Z., Fikselová, M. (2009) The effects of different treated brans additions on bread quality. *SAB*. **40(2)**, 67–72.

Antoine, C., Peyron, S., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., Rouau, X. (2004) Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers. *J Cereal Sci.* **39 (3)**, 387-393.

Auffret, A., Ralet, M. C., Guillon, F., Barry, J. L., Thibault, J. F. (1994) Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibers. *LWT- Food Sci Technol.* **27(2)**, 166–172.

Baltacıoğlu, H., Bayındırlı, A., Severcan, F. (2013) Inactivation of Mushroom Polyphenoloxidase (PPO) by Thermosonication, Doktorski rad, Middle East Technical University.

Barron, C., Surget, A., Rouau, X. (2007) Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J Cereal Sci.* **45**, 88-96.

Begum, A. N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen, S. M., Adlercreutz, H., Remesy, C., Scalbert, A. (2004) Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J Nutr.* **134**, 120-7.

Behne, D., Kyriakopoulos, A. (2001) Mammalian Selenium-Containing Proteins. *Ann Rev Nutr.* **21**, 453-73.

Belščak, A., Komes, D., Horžić, D., Ganić, K. K., Karlović, D. (2009) Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res. Int.* **42 (5-6)**, 707-716.

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.

- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., Sapirstein, H. D. (2005) Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chem.* **82(4)**, 390-393.
- Bhat, R., Kamaruddin, N. S., Min-Tze, L., Karim, A. A. (2011) Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason Sonochem.* **18(6)**, 1295-300.
- Bondia-Pons, I., Aura, A-M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2009) Rye phenolics in nutrition and health. *J Cereal Sci.* **49**, 323-36.
- Braje, M. (2017) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na slobodne fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost bučine pogače, heljde i prosa. Diplomski rad. Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.
- Brown, K. M., Arthur, J.R. (2001) Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* **4**, 593-9.
- Caminiti, I. M., Noci, F., Muñoz, A., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A., Lyng, J. G. (2011) Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chem.* **124**, 1387-1392.
- Castelluccio, C., Bolwell, G. P., Gerrish, C., Rice-Evans, C. (1996) Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem J.* **316**, 691-4.
- Chalamacharla, R. B., Harsha, K., Sheik, K. B., Viswanatha, C. K. (2018) Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. *Adv Biotech & Micro.* **9(1)** :555754.
- 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.
- Chen, J. S., Rolle, R. S., Marshall, M. R., Wei, C. I. (1991) Comparison of phenol oxidase activity from Florida Spiny lobster and Western Australian lobster. *J. Food Sci.* **56**, 154-157.
- Chen, J., Gao, D., Yang, L., Gao, Y. (2013) Effect of microfluidization process on the functional properties of insoluble dietary fiber. *Food Res Int.* **54**, 1821-1827.
- Chilaka, F. C., Anosike, E. O., Egbuna, P. C. (1993) Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Oil Bean (*P. macrophylla* Benth) seeds. *J Sci Food Agric.* **61**, 125-127.

CIE 15:2004, Technical Report Colorimetry, 3. izd. Commission International de l'Eclairage, Central Bureau.

Craig, S. A. S. (2004) Betaine in human nutrition. *Am J Clin Nutr.* **80**, 539-49.

Das, U. N. (2003) Folic acid says NO to vascular diseases. *Nutrition.* **19**, 686-92.

Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkane, V., Viesturs, U. (2004) Characterization of the radical scavenging activity of lignins--natural antioxidants. *Bioresource Technol.* **95**, 309-17.

Dreese, P. C., Hoseney, R. C. (1982) Baking properties of the bran fraction from brewer spent grains. *Cer Chem.* **59(2)**, 89-91.

Fang, Y-Z., Yang, S., Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* **18**, 872-9.

Fardet, A., Rock, E., Remesy, E. (2008) Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J Cereal Sci.* **48**, 258-76.

Frazzini, V., Rockabrand, E., Mocchegiani, E., Sensi, S. (2006) Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology.* **7**, 307-14.

Ganji, S. H., Qin, S., Zhang, L., Kamanna, V. S., Kashyap, M. L. (2009) Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* **202**, 68-75.

Gao, L., Wang, S., Oomah, B. D., Mazza, G. (2002) Wheat Quality: Antioxidant Activity of Wheat Millstreams. American Association of Cereal Chemists International, St.Paul, MN, str. 219-233.

Ghafoor, M., Misra, N. N., Mahadevan, K., Tiwari, B.K. (2014) Ultrasound assisted hydration of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ultrason. Sonochem.* **21 (1)**, 409-414.

Gökmen, V., Serpen, A., Fogliano, V. (2009) Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends Food Sci Technol.* **20**, 278-288.

Graf, E. (1983) Applications of phytic acid. *J Am Oil Chem Soc.* **60**, 1861-7.

Graf, E. (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Bio Med.* **13**, 435-48.

Hageman, G. J., Stierum, R. H. (2001) Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutat Res-Fund Mol M.* **475**, 45-56.

- Hayden, M., Tyagi, S. (2004) Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J.* **3**, 4.
- Hemdane, S., Leys, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2015) Wheat milling by-products and their impact on bread making. *Food Chem.* **187(11)**, 280-289.
- Hemery, Y., Mateo Anson, N., Havenaar, R., Haenen, G., Noort, M., Rouau, X. (2010) Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions. *Food Res Int.* **43**, 1429-1438.
- Hladyszowski, J., Zubik, L., Kozubek, A. (1998) Quantum Mechanical and Experimental Oxidation Studies of Pentadecylresorcinol, Olivetol, Orcinol and Resorcinol. *Free Radical Res.* **28**, 359 – 68
- 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, R. F. S., Yaong, H. C., Chen, S. C., Lu, Y. F. (2004) In vitro folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Brit J Nutr.* **92**, 887-94.
- Irwin, P. L., Pfeffer, P. E., Doner, L. W., Sapers, G. M., Brewster, J. D., Nagahashi, G., Hicks, K. B. (1994) Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr Res.* **256**, 13–17.
- Jang, J., Moon, K. (2011) Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food chem.* **124**, 444-449.
- Kamal-Eldin A, Pours A, Eliasson C, man P. (2001) Alkylresorcinols as antioxidants: hydrogen donation and peroxy radical-scavenging effects. *J Sci Food Agr.* **81**, 353-6.
- Kamanna, V., Ganji, S., Kashyap, M. (2009) Niacin: An old drug rejuvenated. *Curr Atheroscler Rep.* **11**, 45-51.
- Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Wijewickreme, A. N., Thompson, L. U. (1999) Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem.* **202**, 91-100.

- Klepacka, J., Fornal, L. (2006) Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev Food Sci.* **46**, 639-47.
- Knorr, D., Ade-Omowaye, B.I.O., Heinz, V. (2002) Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proc Nutr Soc.* **61**, 311–318.
- Kozubek, A., Tyman, J. H P. (1998) Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chem Rev.* **99**, 1-26.
- Kuniak, L., Marchess, R. H. (1972) Study of crosslinking reaction between epichlorohydrin and starch. *Starch.* **24(4)**, 110–116.
- Lábaj, J., Wsóllová, L., Lazarová, M., Košíková, B., Slameňová, D. (2004) Repair of oxidative DNA lesions in blood lymphocytes isolated from Sprague-Dawley rats; the influence of dietary intake of lignin. *Neoplasma.* **51**, 451-7.
- Lai, C. S., Hoseney, R. C., Davis, A. B. (1989) Effects of wheat bran in breadmaking. *Cer Chem.* **66(3)**, 217–219.
- Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P. E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struc Biol.* **11**, 39-46.
- Landberg, R., Kamal-Eldin, A., Salmenkallio-Marttila, M., Rouau, X., Åman, P. (2008) Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels. *J Cereal Sci.* **48**, 401-6.
- Leadley, C. E., Williams, A. (2006) Pulsed Electric Field Processing, Power Ultrasound and Other Emerging Technologies. U: Food Processing Handbook, (J.G. Brennan., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 201-235.
- Li, L., Harflett, C., Beale, M. H., Ward, J. L. (2009) Phenolic acids. U: *Healthgrain methods: Analysis of bioactive components in small grain cereals.* (Shewry, P. R. Ward, J. L., ured.), St Paul, MN: AACC International, Inc., str. 41-52.
- Li, J., Kang, J., Wang, L., Li, Z., Wang, R., Chen, Z. X., Hou, G. G. (2012) Effect of water migration between arabinoxylans and gluten on baking quality of whole wheat bread detected by magnetic resonance imaging (MRI). *J Agr Food Chem.* **60(26)**, 6507–6514.
- Liu, R. H. (2007) Whole grain phytochemicals and health. *J Cereal Sci.* **46**, 207-19.
- Liu, S., Liu, Y., Huang, X., Yang, W., Hu, W., Pan, S. (2016) Effect of ultrasonic processing on the changes in activity, aggregation, and the secondary and tertiary structure of polyphenol oxidase in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino):

Effect of ultrasound on polyphenol oxidase in oriental sweet melon. *J Sci Food Agr.* **97(4)**, 1326-1334.

Liyana-Pathirana, A. M., Shahidi, F. (2006) Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *J Agr Food Chem.* **54**, 1256-1264.

Lopez, H. W., Duclos, V., Coudray, C., Krespine, V., Feillet-Coudray, C., Messenger, A., Demigné, C., Rémésy, C. (2003) Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition.* **19**, 524-30.

Lopez, P., Sala, F. J., Fuente, J. L., Condon, S., Raso, J., and Burgos, J. (1994) Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polyphenol oxidase by manothermosonication. *J Agric Food Chem.* **42(2)**, 253–256.

Manchun, S., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S., Sriamornsak, P. (2012) Effect of Ultrasonic Treatment on Physical Properties of Tapioca Starch. *Adv Mat Res* **506**, 294-297.

Mason, H. S. (1955) Comparative biochemistry of the phenolase complex. U: Advances in Enzymology, (Nord, F. F., ured.), Interscience, New York, Volumen 16. str. 105.

Mateo Anson, N. (2010) Bioactive compounds in whole grain wheat. Maastricht University, Maastricht, str. 16.

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

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.

McKevith, B. (2004) Nutritional aspects of cereals. *Nutr Bull.* **29**, 111-42.

Miano, A. C., Ibarz, A., Augusto, P., E., D. (2016) Ultrasound technology enhances the hydration of corn kernels without affecting their starch properties. *J Food Eng.* **197**, 34-43.

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.

- Miyamoto, S., Kuwata, G., Imai, M., Nagao, A., Terao, J. (2000) Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids*. **35**, 1411-4.
- Morris, C., Brody, A. L., Wicker, L. (2007) Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Packag Techn Sci*. **20**, 275-286.
- Muraoka S, Miura T. (2004) Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci*. **74**, 1691-700
- Ngalani, J. A., Signoret, A., Crouzet, J. (1993) Partial purification and properties of plantain polyphenol oxidase. *Food Chem*. **48**, 341–347
- Niu, M., Hou, G., Lee, B., Chen, Z. X. (2014c) Effects of fine grinding of millfeeds on the quality attributes of reconstituted whole-wheat flour and its raw noodle products. *Lwt-Food Sci Technol*. **57(1)**, 58-64.
- Niu, M., Hou, G., Li, X., Li, W., Chen, Z. X. (2014a) Inhibitory effects of ultrasound combined with ascorbic acid or glutathione on enzymatic darkening of whole-wheat raw noodles. *LWT*. **59**, 901-907.
- Niu, M., Hou, G., Wang, L., Chen, Z. X. (2014b) Effects of superfine grinding on the quality characteristics of whole-wheat flour and its raw noodle product. *J Cereal Sci*. **60(2)**, 382-388.
- Noort, M., Van Haaster, D., Hemery, Y., Schols, H., Hamer, R. (2010) The effect of particle size of wheat bran on bread quality-Evidence for fibre-protein interactions. *J Cereal Sci*. **52(1)**, 59-64.
- O'Dell, B. L. (2000) Role of Zinc in Plasma Membrane Function. *J Nutr*. **130**, 1432S-6.
- Palacios, J. P. C. (1990) Poly(ferulic acid) by oxalyl chloride activated polycondensation. *New Polym Mater*. **2**, 167–74.
- Parikka, K., Rowland, I. R., Welch, R. W., Wahala, K. (2006) In Vitro Antioxidant Activity and Antigenotoxicity of 5-n-Alkylresorcinols. *J Agr Food Chem*. **54**, 1646-50.
- Parker, M. L., Ng, A., Waldron, K. W. (2005) The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J Sci Food Agr*. **85**, 2539- 2547.
- Patero, T., Augusto, P. E. D. (2015) Ultrasound (US) enhances the hydration of sorghum (*Sorghum bicolor*) grains. *Ultrason. Sonochem*. **23 (0)**, 11-15.

- Pool-Zobel, B. L., Adlercreutz, H., Gleis, M., Liegibel, U. M., Sittlington, J., Rowland, I., Wahala, K., Rechkemmer, G. (2000) Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis*. **21**, 1247-52.
- Powers, H. J. (2003) Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr*. **77**, 1352-60.
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizikalnih i kemijskih analiza za kontrolu kvalitete žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, tjestenina i brzo smrznutih tijesta (2011) *Narodne novine* **28**, Zagreb.
- Preuckler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Höltinger, S., Haas, S. (2014) Wheat-bran based biorefinery: composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT- Food Sci Technol*. **56(2)**, 211-221.
- 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.
- Rezk, B. M., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (2003) Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. *FEBS Lett*. **555**, 601-5.
- Richardson, T., Hyslop, D. B. (1985) Enzymes. U: Food Chemistry, (Fennema, O. R., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 446-447.
- Rogers, D., Hosney, R. C. (1982) Problems associated with producing whole wheat bread. *CFW*. **27**, 451-456.
- Roosendaal, H., Abu-Hardan, M., Frazier, R. A. (2012) Thermogravimetric analysis of water release from wheat flour and wheat bran suspensions. *J Food Eng*. **111(4)**, 606-611.
- Shaheen, A. A., Abd El-Fattah, A. A. (1995) Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int J Biochem Cell B*. **27**, 89-95.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2010) Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem Rev*. **9**, 147.
- Sies, H., Murphy, M. E. (1991) Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photoch Photob B*. **8**, 211-8.
- Slyshenkov, V. S., Dymkowska, D., Wojtczak, L. (2004) Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett*. **569**, 169-72.

- Slyshenkov, V. S., Piwocka, K., Sikora, E., Wojtczak, L. (2001) Pantothenic acid protects jurkat cells against ultraviolet light-induced apoptosis. *Free Radical Biol Med.* **30**, 1303-10.
- Song, X., Zhu, W., Pei, Y., Ai, Z., Chen, J. (2013) Effects of wheat bran with different colors on the qualities of dry noodles. *J Cereal Sci.* **58(3)**, 400-407.
- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., Menon, V. P. (2007) Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr.* **40**, 92-100.
- Sun, Y., Zhong, L., Cao, L., Lin, W., Ye, X. (2015) Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*malus pumilamill*, cv. Red Fuji) juice. *J Food Sci Technol.* **52(12)**, 8336–8342.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Cullen, P. J. (2008) Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *J Agric Food Chem.* **56(21)**, 10071-7.
- Traber, M. G., Atkinson, J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Bio Med.* **43**, 4-15.
- van Haften, R. I. M., Haenen, G. R. M. M., Evelo, C. T. A. , Bast, A. (2003) Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metab Rev.* **35**, 215 - 53.
- Vetter, J. L. (1984) Fiber as a food ingredient. *J Food Technol.* **38(1)**, 64.
- Wang, L., Hou, G. G., Hsu, Y. H., Zhou, L. R. (2011) Effect of phosphate salts on the Korean non-fried instant noodle quality. *J Cereal Sci.* **54(3)**, 506-512.
- Yang, T. Y., Bai, Y. X., Wu, F. F., Yang, N. J., Zhang, Y. J., Bashari, M., Jin, Z. Y., Xu, X. M. (2014) Combined effects of glucose oxidase, papain and xylanase on browning inhibition and characteristics of fresh whole wheat dough. *J Cereal Sci.* **60(1)**, 249-254.
- Yildirim, A., Öner, M.D., Bayram, M. (2013) Effect of soaking and ultrasound treatments on texture of chickpea. *J. Food Sci. Technol.* **50 (3)**, 455-465.
- Yu, L., Moore, J. (2008) Effects of extraction method and conditions on wheat antioxidant activity estimation. U: Wheat Antioxidants, (Yu, L., ured.), John Wiley & Sons, New Jersey. str 100-117.
- Zeisel, S. H., Blusztajn, J. K. (2003) Choline and Human Nutrition. *Ann Rev Nutr.* **14**, 269-96.
- Zhang, D. C., Moore, W. R. (1997) Effect of wheat bran particle size on dough rheological properties. *J Sci Food Agr.* **74(4)**, 490–496.

- Zhang, D., Moore, W. R. (1999) Wheat bran particle size effects on bread baking performance and quality. *J Sci Food Agr.* **79(6)**, 805-809.
- Zhao, Z., Moghadasian, M. H. (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem.* **109**, 691-702.
- Zhou, K., Laux, J., Yu, L. (2004) Comparison of swiss red wheat grain and fractions for their antioxidant properties. *J Agr Food Chem.* **52**, 1118-1123.
- Zhou, P., Smith, N. L., Lee, C. Y. (1993) Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 532–536.
- Zhu, K.-X., Lian, C.-X., Guo, X.-N., Peng, W., Zhou, H.-M. (2011) Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chem.* **126(3)**, 1122-1126.
- Zou, Y., Hou, X. (2017) Sonication enhances quality and antioxidant activity of blueberry juice. *Food Sci. Technol.* **37**, 599-603.